

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

Edinéia Lemos de Andrade

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPA1 NA
HIPERATIVIDADE DA BEXIGA URINÁRIA INDUZIDA
POR LESÃO MEDULAR EM RATOS**

Florianópolis

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Edinéia Lemos de Andrade

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPA1 NA
HIPERATIVIDADE DA BEXIGA URINÁRIA INDUZIDA
POR LESÃO MEDULAR EM RATOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Co-orientador: Dr^a. Janice Koepf

Florianópolis

2010

Catologação na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

A553p Andrade, Edinéia Lemos de
Participação do receptor TRPA1 na hiperatividade
urinária da bexiga urinária induzida por lesão em ratos
[tese] / Edinéia Lemos de Andrade ; orientador, João
Batista Calixto, co-orientadora, Janice Koepp. -
Florianópolis, SC, 2010.
121 p.: il., grafs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Medula espinhal - Ferimentos e
lesões. 3. Bexiga. I. Calixto, João Batista. II. Koepp,
Janice. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

CDU 615

*Dedico este trabalho aos meus pais, Osny e Amália.
Agradeço-lhes pelo amor, carinho, respeito e confiança.
Amo-os eternamente.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Osny e Amália, pelo amor incondicional.

A toda a minha família pelo afeto e amizade.

Ao Júlio, em especial, que sempre me desejou o melhor.

Ao professor João B. Calixto, por acreditar no meu trabalho e por participar de mais esta etapa da minha formação profissional, o meu respeito e o meu agradecimento.

À Janice Koepp pela amizade, colaboração e incentivo.

Ao professor Juliano Ferreira por ser solícito sempre que precisei, durante muitos anos. Obrigada por tudo.

Ao professor Marcus Vinícius Gomez, ao Célio de Castro Jr e à Alessandra H. Souza pela colaboração e principalmente pela atenção.

Aos colegas e ex-colegas de trabalho, todos sem exceção, pela ótima convivência e pelo carinho. Em especial a elas: Gecioni L. Neckel, Stefânia Forner, Cláudia P. Figueiredo, Juliana S. Chaves, Daniela F. P. Leite, Juliana Fabris, Maíra Cola e Maíra A. Bicca e a eles: Allisson F. Bento, Rafael C. Dutra, Alexandre P. Rogério e Jarbas S. Motta. O nome de todos será lembrado sempre.

À Daniela pelo auxílio e apoio em situações difíceis. Foi ótimo trabalhar contigo.

À Stefânia, à Alessandra, à Geci e à Claudia por suportarem meus “surto” e meu “positivismo” com bom humor. Com certeza esses momentos se tornaram mais leves e agradáveis pela amizade de vocês. Obrigada pela ajuda, apoio e carinho.

À Aline M. V. Garcia, à Juliana G. da Cunha, à Patrícia V. Abreu e ao Pedro por colaborarem para o desenvolvimento deste projeto.

A todos os professores e funcionários deste departamento pela dedicação à pesquisa e ao ensino.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

*Não deixe que a saudade sufoque,
que a rotina acomode,
que o medo impeça de tentar.
Desconfie do destino e acredite em você.
Gaste mais horas realizando
que sonhando,
fazendo que planejando,
vivendo que esperando
porque, embora
quem quase morre esteja vivo,
quem quase vive já morreu.”
(Luiz Fernando Veríssimo).*

RESUMO

A proposta deste estudo foi avaliar a relevância do receptor TRPA1 (receptor de potencial transitório com domínios tipo anquirina 1) na hiperatividade da bexiga urinária decorrente da lesão medular em ratos. A lesão medular resultou em alterações na capacidade locomotora dos animais, em hipertrofia muscular e dano na bexiga urinária, representado pela perda de células uroteliais, formação de edema, deposição de fibrina e infiltração de neutrófilos, bem como por mudanças na contratilidade do órgão e nos parâmetros urodinâmicos envolvidos no processo de micção. Além disso, a lesão medular induziu aumento nos níveis do RNAm e da expressão do receptor TRPA1 na bexiga urinária e nos neurônios do GRD (gânglio da raiz dorsal) e da expressão do receptor TRPV1 (receptor de potencial transitório vanilóide 1) na bexiga urinária, nos neurônios do GRD (L6-S1) e na porção correspondente da medula espinhal. A exposição do KCl (agente despolarizante), carbacol (agonista de receptores muscarínicos), cinamaldeído (agonista do receptor TRPA1) ou da capsaicina (agonista do receptor TRPV1) às preparações de bexiga urinária induziu resposta contrátil, a qual foi potencializada pela lesão medular. A pré-incubação das preparações de bexiga urinária com HC-030031 (antagonista do receptor TRPA1) ou com SB-366791 (antagonista do receptor TRPV1), ou ainda o tratamento intratecal com antisense oligodeoxinucleotídeo para o receptor TRPA1 (AS-ODN TRPA1), todos reduziram significativamente a resposta contrátil da bexiga urinária induzida pelo cinamaldeído. Por outro lado, o tratamento intratecal com AS-ODN TRPA1 não interferiu com a resposta contrátil induzida pelo carbacol (agonista muscarínico). Ademais, a remoção das células uroteliais reduziu a resposta contrátil mediada pelo cinamaldeído ou pelo carbacol. A lesão medular aumentou a amplitude da atividade fásica espontânea da bexiga urinária, o número de contrações não associadas à micção (CNMs), a pressão basal, a pressão limiar, a capacidade de armazenamento da bexiga urinária, o volume residual e reduziu o intervalo entre as contrações, o volume eliminado e a eficiência do esvaziamento vesical. O tratamento sistêmico agudo com HC-030031 reduziu significativamente a amplitude e o número de CNMs, enquanto o tratamento intratecal com AS-ODN TRPA1 reduziu o número de CNMs e normalizou a atividade fásica espontânea da bexiga urinária. Além disso, o tratamento com AS-ODN TRPA1 reduziu acentuadamente a expressão do receptor TRPA1 nos neurônios do GRD

(L6-S1), na porção correspondente da medular espinhal, no músculo detrusor, porém não no urotélio da bexiga urinária. Estudos realizados em cultura neuronal mostraram que a lesão medular induziu aumento na proporção de neurônios do GRD (L6-S1) responsivos e na mobilização de cálcio intracelular ao estímulo com cinamaldeído e apenas na mobilização de cálcio intracelular ao estímulo com capsaicina. A exposição dos neurônios do GRD (L6-S1) às neurotrofinas NGF (fator de crescimento derivado do nervo) ou BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) induziu aumento na mobilização de cálcio intracelular ao estímulo com cinamaldeído ou capsaicina, enquanto a exposição ao BDNF induziu aumento na proporção de neurônios do GRD responsivos ao cinamaldeído. Finalmente, após a lesão medular os níveis de NGF e BDNF foram aumentados na bexiga urinária, nos neurônios do GRD (L6-S1) e na porção correspondente da medula espinhal. Em conjunto, os resultados sugerem que o modelo animal de lesão medular utilizado neste estudo reproduziu as alterações fisiopatológicas no trato urinário inferior e evidencia um papel importante do receptor TRPA1 na hiperatividade urinária causada pela lesão medular em ratos.

Palavras-chave: Lesão Medular. Bexiga urinária hiperativa. Receptor TRPA1. Receptor TRPV1.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the relevance of TRPA1 receptor (transient receptor potential ankyrin-like 1) in overactive urinary bladder caused by spinal cord injury in rats. Spinal cord injury resulted in locomotor capacity alteration, muscular hypertrophy and damage in urinary bladder, represented by urothelial cell loss, edema formation, fibrin deposition and neutrophil infiltration, as well as by changes in contractility urinary bladder and in urodynamic parameters of the micturition process. Moreover, spinal cord injury induced up-regulation of TRPA1 protein and mRNA levels in urinary bladder and in DRG (dorsal root ganglion) neurons and also TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) protein levels in urinary bladder, DRG neurons and in corresponding segment of the spinal cord. The exposure of KCl (depolarizing agent), carbachol (muscarinic receptors agonist), cinnamaldehyde (TRPA1 receptor agonist), or capsaicin (TRPV1 receptor agonist) to urinary bladder preparations induced contractile response, which was potentiated by spinal cord injury. The pre-incubation of the urinary bladder preparations with HC-030031 (TRPA1 receptor antagonist) or SB-366791 (TRPV1 receptor antagonist), or the intrathecal treatment with TRPA1 antisense oligodeoxynucleotide (TRPA1 AS-ODN), all significantly reduced the cinnamaldehyde-induced contractile response. The other hand, the intrathecal treatment with TRPA1 AS-ODN did not interfere on the contractile response induced by carbachol (muscarinic receptors agonist). In addition, the removal of urothelial cells reduced the contractile response mediated by cinnamaldehyde or carbachol. Spinal cord injury increased the amplitude of spontaneous phasic activity of the urinary bladder, the number of non-voiding contractions (NVCs), the basal pressure, the threshold pressure, the urinary bladder capacity, the residual volume and reduced the inter-contraction interval, voided volume and the urinary voiding efficiency. Systemic acute treatment with HC-030031 significantly reduced the amplitude and the number of NVCs, while the intrathecal treatment with TRPA1 AS-ODN reduced the number of NVCs and normalized the spontaneous phasic activity of the urinary bladder. Moreover, TRPA1 AS-ODN treatment markedly reduced the TRPA1 receptor expression in DRG neurons (L6-S1), in corresponding segment of the spinal cord, in detrusor muscle, but not in urothelium of the urinary bladder. Studies carried out in neuronal

cultures showed that spinal cord injury induced increase in the proportion of cinnamaldehyde-responsive DRG neurons (L6-S1) and cinnamaldehyde-induced intracellular calcium mobilization and only in capsaicin-induced intracellular calcium mobilization. The exposure of DRG neurons (L6-S1) to neurotrophins NGF (nerve growth factor) or BDNF (brain-derived neurotrophic factor) increased the cinnamaldehyde or capsaicin-induced calcium mobilization, while the BDNF exposure induced increase in the proportion of cinnamaldehyde-responsive DRG neurons (L6-S1). Finally, after spinal cord injury the NGF and BDNF levels were increased in urinary bladder, DRG neurons (L6-S1) and in corresponding segment of the spinal cord. Taken together, the results suggest that the animal model of spinal cord injury used in this study reproduced the physiopathological alterations in lower urinary tract and evidence an important role of TRPA1 receptor in overactive urinary bladder caused by spinal cord injury in rats.

Keywords: Spinal cord injury. Overactive urinary bladder. TRPA1 receptor. TRPV1 receptor.

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1 - Inervação do trato urinário inferior	4
Figura 2 - Interações químicas entre células uroteliais, fibras nervosas eferentes e células intersticiais na bexiga urinária	7
Figura 3 - Reflexo de micção em indivíduos normais e indivíduos paraplégicos aferentes	10
Figura 4 - Atividade locomotora dos animais	33
Figura 5 - Alterações histopatológicas da bexiga urinária após a lesão medular.....	35
Figura 6 - Determinação dos níveis de RNAm para o receptor TRPA1 após a lesão medular	36
Figura 7 - Expressão do receptor TRPA1 na bexiga urinária após a lesão medular	37
Figura 8 - Expressão do receptor TRPA1 nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (segmentos medulares L6-S1) e na porção correspondente da medula espinhal após a lesão medular.	38
Figura 9 - Expressão do receptor TRPV1 na bexiga urinária após a lesão medular	39
Figura 10 - Expressão do receptor TRPV1 nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (segmentos medulares L6-S1) e na porção correspondente da medula espinhal após a lesão medular	40
Figura 11 - Resposta contrátil da bexiga urinária induzida pela ativação de receptores TRPA1 e TRPV1 após a lesão medular	41
Figura 12 - Resposta contrátil da bexiga urinária induzida pela ativação de receptores muscarínicos e pela despolarização celular após a lesão medular.....	42
Figura 13 - Participação do urotélio na resposta contrátil da bexiga urinária induzida pela ativação de receptores TRPA1 e muscarínicos..	43
Figura 14 - Curva concentração-resposta inibitória para o antagonista do receptor TRPA1, o HC-030031, na resposta contrátil induzida pelo cinamaldeído	44

Figura 15 - Curva concentração-resposta inibitória para o antagonista do receptor TRPV1, o SB-366791, na resposta contrátil induzida cinamaldeído	45
Figura 16 - Efeito da inibição da síntese do receptor TRPA1 sobre as atividades fásica espontânea e contrátil da bexiga urinária após a lesão medular.....	46
Figura 17 - Registros cistométricos representativos.....	48
Figura 18 - Efeito do tratamento sistêmico com HC-030031 sobre a amplitude e número de contrações não associadas à micção	50
Figura 19 - Efeito da inibição da síntese do receptor TRPA1 sobre a amplitude e número de contrações não associadas à micção.....	51
Figura 20 - Expressão do receptor TRPA1 na bexiga urinária após o tratamento com antisense oligodeoxinucleotídeo para o TRPA1.....	53
Figura 21 - Expressão do receptor TRPA1 nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (segmentos medulares L6-S1) e na porção correspondente da medula espinhal após o tratamento com antisense oligodeoxinucleotídeo para o TRPA1.....	54
Figura 22 - Efeito da lesão medular sobre a funcionalidade dos neurônios do gânglio da raiz dorsal.....	56
Figura 23 - Efeito dos fatores neurotróficos sobre a funcionalidade dos neurônios do gânglio da raiz dorsal.....	58
Figura 24 - Determinação dos níveis de NGF após a lesão medular....	59
Figura 25 - Determinação dos níveis de BDNF após a lesão medular .	60
Figura 26 - Mecanismos propostos para a participação do receptor TRPA1 na hiperatividade da bexiga urinária decorrente da lesão medular.....	75

LISTA DE TABELAS

	pág.
Tabela 1 - Alterações dos parâmetros urodinâmicos induzidos pela lesão medular	47
Tabela 2 - Efeito do tratamento sistêmico com HC-030031 sobre os parâmetros urodinâmicos	49
Tabela 3 - Efeito da inibição da síntese do receptor TRPA1 sobre os parâmetros urodinâmicos	51
Tabela 4 - Efeito da lesão medular sobre a responsividade dos neurônios do do gânglio da raiz dorsal.....	55
Tabela 5 - Efeito dos fatores neurotróficos sobre a responsividade dos neurônios do do gânglio da raiz dorsal.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AS-ODN - antisense oligodeoxinucleotídeo
ATP - adenosina trifosfato
BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro
CBU - capacidade da bexiga urinária
CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CI₅₀ - concentração inibitória de 50%
CNM - contração não associada à micção
E.P.M. - erro padrão da média
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
EEV - eficiência de esvaziamento vesical
EUE - esfíncter uretral externo
GDNF - fator neurotrófico derivado da glia
GRD - gânglio da raiz dorsal
IC - intervalo entre as contrações
mg - miligrama
M-MLV - Moloney Murine Leukemia Virus
MS-ODN - missense oligodeoxinucleotídeo
MPO - mieloperoxidase
NGF - fator de crescimento neuronal
NT 3 e 4 - neurotrofinas 3 e 4
PB - pressão basal
PBS - salina tamponada com fosfato
pg - picograma
PL - pressão limiar
PM - pressão de micção
PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonila
RNA - Ácido ribonucléico
RNAm - Ácido ribonucléico mensageiro
RNAm - RNA mensageiro
Trk - tirosina quinase
TRP - receptor de potencial transitório
TRPA1 - TRP com domínios tipo anquirina 1
TRPV1 - TRP vanilóide 1
VE - volume eliminado
μM - micromolar

SUMÁRIO

	pág.
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Anatomia e inervação do trato urinário inferior	2
1.2 Mecanismos reflexos para o controle da micção.....	5
1.3 Propriedades sensoriais das células uroteliais da bexiga urinária	6
1.4 Fisiopatologia do processo de micção.....	7
1.5 Efeito da lesão medular sobre o reflexo de micção.....	8
1.6 Neuroplasticidade das vias aferentes da bexiga urinária.....	11
1.7 Receptores de potencial transitório (TRP) como alvo terapêutico para a hiperatividade urinária.....	12
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Animais	19
3.2 Indução da lesão medular.....	19
3.3 Implantação de cateter intratecal	20
3.4 Avaliação da atividade locomotora dos animais	21
3.5 Análise histopatológica da bexiga urinária.....	22
3.6 Bexiga urinária isolada de rato.....	23
3.7 Avaliação da contratilidade da bexiga urinária isolada a estímulos exógenos.....	23
3.8 Avaliação urodinâmica através da cistometria	24
3.9 Extração do RNA total	25
3.10 Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real)	26
3.11 Preparo dos cortes histológicos e reação antigênica	27
3.12 Detecção imunológica	28
3.13 Cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal	29
3.14 Ensaio de mobilização de cálcio	29
3.15 Dosagem de fatores neurotróficos.....	30

3.16 Drogas e Reagentes	31
3.17 Análise estatística.....	32
4 RESULTADOS	32
4.1 Alterações fisiopatológicas decorrentes da lesão medular	32
4.2 Alterações histopatológicas decorrentes da lesão medular.....	33
4.3 Análise dos níveis de RNAm codificador do receptor TRPA1 após a lesão medular	36
4.4 Análise da expressão dos receptores TRPA1 e TRPV1 após a lesão medular	37
4.5 Atividade contrátil da bexiga urinária após a lesão medular.....	41
4.6 Participação das células uroteliais na atividade contrátil da bexiga urinária	42
4.7 Efeito do bloqueio farmacológico <i>in vitro</i> sobre a atividade da bexiga urinária após a lesão medular	43
4.8 Efeito do bloqueio <i>in vivo</i> da síntese do receptor TRPA1 sobre as atividades fásica espontânea e contrátil da da bexiga urinária após a lesão medular	45
4.9 Cistometria	46
4.10 Análise da expressão do receptor TRPA1 após o tratamento com antisense oligodeoxinucleotídeo para o TRPA1.....	52
4.11 Influência da lesão medular sobre a responsividade e funcionalidade dos receptores TRPA1 e TRPV1 de neurônios do gânglio da raiz dorsal	55
4.12 Influência dos fatores neurotróficos sobre a responsividade e funcionalidade dos receptores TRPA1 e TRPV1 de neurônios do gânglio da raiz dorsal	57
4.13 Níveis de NGF e BDNF após a lesão medular	58
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÃO	74
7 BIBLIOGRAFIA	76
8 ANEXOS	88

1. INTRODUÇÃO

A lesão medular acomete mundialmente cerca de 2,5 milhões de pessoas (Schwab et al., 2006). No Brasil, segundo a assistência à criança deficiente (AACD) estima-se o surgimento de 6000 novos casos a cada ano. A violência urbana dos grandes centros está nitidamente ligada a estes dados estatísticos, porém a etiologia do trauma medular varia em função das características de cada região e do tipo de atividade da população. As lesões medulares são em 80% dos casos de origem traumática, principalmente por projéteis de arma de fogo (40%), acidentes automobilísticos (30%) e mergulho (15%). Os homens com média de idade de 25 anos são os mais acometidos (65%), dos quais, 70% tornam-se paraplégicos (paralisia parcial ou completa de parte ou ambos os membros inferiores e tronco, resultante de lesões na medula espinhal torácica, lombar ou sacral) e 30% tetraplégicos (paralisia parcial ou completa dos quatro membros e tronco, resultante de lesões na medula cervical) (Schmitz et al., 2004).

O traumatismo na medula espinhal pode resultar em alterações nas funções motora, sensitiva e autonômica, implicando em perda parcial ou total dos movimentos voluntários ou da sensibilidade (tátil, dolorosa e profunda) em membros superiores e/ou inferiores além de alterações no funcionamento dos sistemas urinário, intestinal, respiratório, circulatório, sexual e reprodutivo (Lianza et al., 2001). Especificamente, as lesões da medula espinhal em nível tóraco-lombar podem causar graves disfunções do trato urinário inferior, incluindo hiperatividade da bexiga urinária, dissinergia vésico-esfincteriana e retenção urinária, as quais causam alto impacto sob a qualidade de vida dos pacientes. Em estudo multidisciplinar realizado pelo *National Spinal Cord Injury Statistical Center*, foram avaliadas as causas relacionadas às reinternações dos portadores de lesão medular, sendo observado que as principais causas são as complicações no trato urinário inferior, como as infecções urinárias recorrentes e as doenças do trato respiratório (Cardenas et al., 2004). Ademais, as estatísticas internacionais indicam que cerca de 50 milhões de pessoas são acometidas pela hiperatividade urinária de diferentes etiologias (Ouslander, 2004).

Neste contexto, esta tese está focada na hiperatividade urinária decorrente de lesão medular em ratos. Portanto, para a compreensão geral do trabalho será apresentado um embasamento teórico sobre a anatomia e a fisiologia do trato urinário inferior, fisiopatologia da hiperatividade urinária e alguns alvos terapêuticos. Em seguida, serão descritos os materiais e métodos utilizados para a realização deste

estudo bem como os resultados obtidos nos experimentos funcionais e moleculares. Por fim, será apresentada uma discussão integrada dos resultados seguida das conclusões finais acerca da participação do receptor TRPA1 na hiperatividade da urinária induzida pela lesão medular.

1.1 Anatomia e inervação do trato urinário inferior

O trato urinário inferior é formado pela bexiga urinária e uretra e por uma complexa interação de impulsos neurais, consistindo de controles voluntários e involuntários que interagem com estruturas anatômicas da pelve como o assoalho pélvico, formando a unidade funcional responsável pela continência urinária (Silva e Karram, 2004).

A bexiga urinária é um órgão pélvico muscular composto por diferentes camadas de tecidos. A mucosa (interna) é composta de células epiteliais que formam o urotélio, as quais se distendem e diminuem em espessura quando a bexiga urinária se enche. A submucosa é composta de células conjuntivas, que servem para dar suporte à mucosa. A camada muscular é constituída por células musculares lisas que formam o músculo detrusor, e a camada serosa (externa) é constituída de tecido adiposo e conjuntivo (Graaf e Rhees, 1991). A extremidade superior é denominada corpo da bexiga e a inferior de colo vesical, o qual está localizado na junção da base da bexiga urinária com a uretra. Nesta região, a musculatura está disposta em três camadas (interna, média e externa) que, quando em contração, contribuem para o fechamento do esfíncter interno, impedindo assim o esvaziamento da bexiga urinária (Dangelo e Fattini, 1997). A uretra é dividida em esfíncter externo ou distal, composto de músculo estriado e em esfíncter interno ou proximal, composto de músculo liso o qual compõe o colo da bexiga urinária (Brading, 1999).

Durante a fase de armazenamento de urina, a pressão da bexiga urinária é mantida baixa devido à sua complacência (capacidade da bexiga urinária em acomodar urina a baixas pressões), determinada pelas propriedades viscoelásticas da parede da bexiga urinária e do tônus muscular (de Groat et al., 1993; Yoshimura e de Groat, 1997a). As propriedades viscoelásticas da parede vesical estão relacionadas à matriz extracelular. Em particular, o colágeno e a elastina são as principais proteínas do tecido conectivo, fornecendo à bexiga urinária resistência e elasticidade, respectivamente (Nagatomi et al., 2004).

As funções normais do trato urinário inferior são a estocagem e a eliminação periódica de urina. Essas funções são realizadas por ações

coordenadas entre o músculo detrusor e o esfíncter uretral sob o controle de um complexo sistema neural localizado na medula espinhal e no cérebro, especificamente na ponte e no córtex cerebral. Este sistema funciona como um circuito para manter uma comunicação entre o reservatório (bexiga urinária) e a via de saída (colo da bexiga urinária e músculo estriado do esfíncter externo da uretra) (de Groat et al., 1993; Chai e Steers, 1996; Yoshimura e de Groat, 1997a).

O controle voluntário do trato urinário inferior necessita de interações entre as vias eferentes autonômicas, mediada pelos nervos pélvico (parassimpático) e hipogástrico (simpático), e somática mediada pelo nervo pudendo (Morrison et al., 2005; Fry et al., 2005). O nervo hipogástrico, o qual surge da região tóraco-lombar da medula espinhal, estimula a contração do esfíncter uretral interno bem como o relaxamento do músculo detrusor durante a fase de enchimento da bexiga urinária. O nervo pélvico, o qual surge da região sacral da medula espinhal, é responsável pela contração do músculo detrusor durante a micção enquanto simultaneamente relaxa o esfíncter uretral interno. O nervo pudendo, composto de fibras somáticas que surgem da região sacral da medula espinhal, mantém o tônus da musculatura do assoalho pélvico, além de excitar o músculo estriado do esfíncter uretral externo (Chancellor e Yoshimura, 2004).

Além de fibras nervosas eferentes, o nervo pélvico, hipogástrico e pudendo contém fibras nervosas aferentes, que conduzem a informação sensorial do trato urinário inferior para a medula espinhal lombo-sacral (Andersson e Wein, 2004). A maior parte da inervação aferente da bexiga urinária e da uretra é representada pelo nervo pélvico (Morrison et al., 2005). Na bexiga urinária de animais e humanos, as fibras aferentes foram identificadas na região suburotelial bem como no músculo detrusor. Na região suburotelial elas formam um plexo nervoso, situado logo abaixo das células uroteliais. Este plexo suburotelial é relativamente esparsa no corpo da bexiga urinária, mas torna-se denso próximo ao colo vesical (Gabella e Davis, 1998).

As fibras nervosas aferentes mais importantes para o início do processo de micção são as que compõem o nervo pélvico, pois monitoram o volume urinário durante a fase de armazenamento e a amplitude das contrações da bexiga urinária durante a micção (de Groat et al., 1993; Yoshimura et al., 2008). O nervo pélvico é composto pelas fibras mielinizadas (A δ) e não mielinizadas (C). As fibras A δ , as quais estão localizadas primariamente no músculo detrusor, possuem baixo limiar mecânico, por isso respondem à distensão passiva e também à contração ativa, convertendo a informação sobre o estado de enchimento

da bexiga urinária. As fibras C, localizadas principalmente no músculo detrusor e próximas ou diretamente adjacentes às células uroteliais, possuem um limiar mecânico maior que as fibras A δ , sendo insensíveis ao enchimento do órgão sob condições fisiológicas, por isso são denominadas de “silenciosas”. Essas fibras respondem primariamente a estímulos nocivos como irritação química ou resfriamento, mas em estados patológicos podem ser sensibilizadas tornando-se responsivas a estímulo mecânico (Yoshimura e Chancellor, 2003). A inervação do trato urinário inferior é mostrada na Figura 1.

Vários tipos de receptores foram identificados nas fibras nervosas aferentes da bexiga urinária, e vários neurotransmissores e mediadores químicos derivados de células uroteliais, células musculares e das próprias fibras nervosas aferentes interagem com estes receptores. Como veremos adiante, estes componentes em conjunto, participam da transdução do sinal responsável pela ativação neuronal.

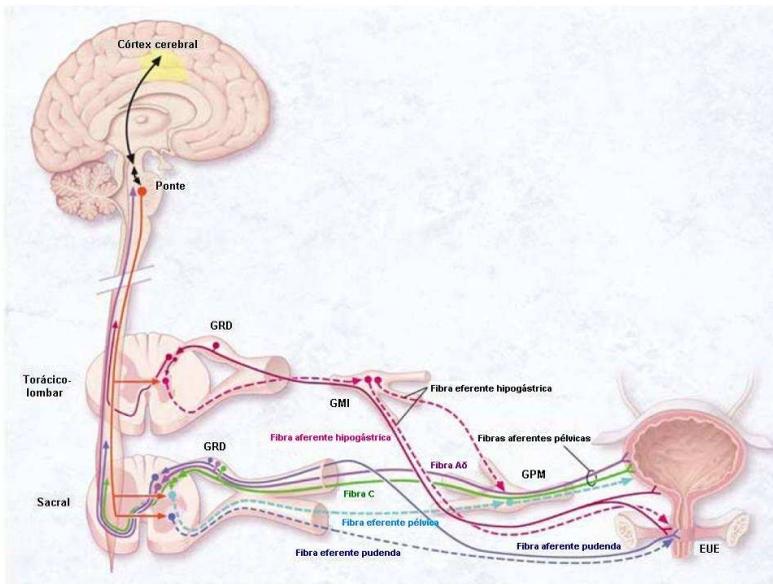


Figura 1. Inervação do trato urinário inferior. A maioria das fibras aferentes A δ e C que inervam a bexiga urinária e a uretra são encontradas no nervo pélvico, o qual também contém eferentes parassimpáticos originados da região sacral da medula espinhal. Outra parte das fibras aferentes é encontrada no nervo hipogástrico, o qual também contém eferentes simpáticos originados da região torácico-lombar da medula espinhal. As inervações aferentes e eferentes somáticas sacrais do esfíncter uretral externo são encontradas no nervo pudendo. GRD: gânglio da raiz dorsal; GPM: gânglio pélvico maior; EUE: esfíncter uretral externo; GMI: gânglio mesentérico inferior (Adaptado de Ford et al., 2006).

1.2 Mecanismos reflexos para o controle da micção

Os requisitos necessários para o processo de micção normal são a sinalização aferente sobre o estado de enchimento da bexiga urinária, a contração coordenada e de magnitude adequada do músculo detrusor, a baixa resistência dos esfíncteres uretrais e a ausência de obstrução anatômica (Campbell et al., 2002).

A pressão intravesical durante a fase de enchimento da bexiga urinária é baixa e relativamente constante, quando o volume de urina está abaixo do limiar para induzir a micção. A capacidade da bexiga urinária em acomodar volumes crescentes de urina é um fenômeno passivo, dependente da quiescência da via eferente parassimpática e como mencionado, pelas propriedades intrínsecas do músculo liso (de Groat, 2006). Além disso, nesta fase há uma atividade rítmica gerada dentro da parede da bexiga urinária e descrita como atividade fásica espontânea ou atividade autônoma (Gillespie, 2004), que envolve ondas de contrações e distensões na parede da bexiga urinária, responsáveis por gerar impulso aferente. Esta atividade tem origem miogênica, podendo ser modulada por mediadores liberados de células uroteliais, células intersticiais e neurônios aferentes (Kanai e Andersson, 2010). A amplitude, mas não a frequência da atividade fásica espontânea da bexiga urinária está aumentada em condições patológicas como na obstrução da bexiga urinária (Brading, 1997) e na lesão medular (Ikeda e Kanai, 2008).

À medida que a bexiga urinária vai enchendo as células uroteliais sensíveis à distensão liberam transmissores de forma contínua, aumentando a sinalização aferente mediada pelas fibras sensoriais A δ (de Groat, 2004, Birder, 2004). A sinalização aferente ativa os nervos simpáticos do nervo hipogástrico que, através da liberação de noradrenalina, induzem o relaxamento do músculo detrusor pela ativação de receptores β_2 e β_3 adrenérgicos e contração do músculo liso do esfíncter uretral interno pela ativação de receptores α_1 adrenérgicos. A inervação somática, através da liberação de acetilcolina, promove contração do músculo esquelético do esfíncter uretral externo e do assoalho pélvico pela ativação de receptores nicotínicos. Em conjunto, estas ações inibem a via parassimpática estimulatória do músculo detrusor (Andersson, 2004). Portanto, as vias neurais que estimulam a bexiga urinária para a micção estão quiescentes durante a fase de enchimento, enquanto as vias inibitórias estão ativas.

Quando o volume de urina atinge um limiar crítico, o reflexo de micção é iniciado. Este é mediado por uma via denominada de espino-

bulbo-espinhal, que conduz as informações sobre o volume da bexiga urinária através das fibras aferentes A δ do nervo pélvico aos centros de coordenação (substância cinzenta periaquedutal e centro pontino da micção) localizados no tronco cerebral. Esta via reflexa é modulada por centros superiores no córtex cerebral envolvidos no controle voluntário da micção. Simultaneamente ao aumento de volume urinário, ocorre aumento das contrações do esfíncter uretral externo e consequentemente da resistência uretral. Para este reflexo de guarda ser revertido e, o esfíncter uretral externo ser relaxado, o centro pontino de micção gera impulsos inibitórios para o centro simpático e somático e impulsos estimulatórios para o centro parassimpático na medula espinhal. Desta forma, o controle realizado pela via espino-bulbo-espinhal resulta em contração coordenada do músculo detrusor através da ativação de receptores muscarínicos M₂ e M₃ pela acetilcolina e purinérgicos P2X₁ pelo ATP, diminuição da resistência uretral pela liberação de óxido nítrico, abertura do colo vesical e escoamento da urina (Blok, 2002).

Resumidamente, a micção é um processo no qual as vias neurais no cérebro e na medula espinhal coordenam as atividades da bexiga urinária e da uretra, alternando entre as fases de armazenamento e eliminação de urina.

1.3 Propriedades sensoriais das células uroteliais da bexiga urinária

Estudos prévios mostram que os mecanismos sensoriais da bexiga urinária não são controlados somente por fibras nervosas, mas também por células não neuronais. Tradicionalmente reconhecidas somente como uma barreira passiva na superfície luminal da bexiga urinária, as células uroteliais (urotélíio) apresentam propriedades sensoriais e de sinalização especializadas que permitem as mesmas responder a estímulos químicos e mecânicos e comunicar-se com fibras nervosas sensoriais e células intersticiais na parede da bexiga urinária (Morrisson et al., 2005; de Groat, 2004; Apodaca, 2004).

Entre as propriedades sensoriais das células uroteliais, podemos destacar a expressão de vários tipos de receptores; responsividade a transmissores liberados de fibras nervosas sensoriais; associação física com fibras aferentes e a habilidade em liberar mediadores químicos tais como ATP (adenosina trifosfato), acetilcolina, óxido nítrico, entre outros. Sendo assim, estas células são capazes de regular a atividade de neurônios sensoriais adjacentes e, portanto, estimular mudanças vasculares locais e/ou a contração da bexiga urinária (de Groat, 2006) (Figura 2).

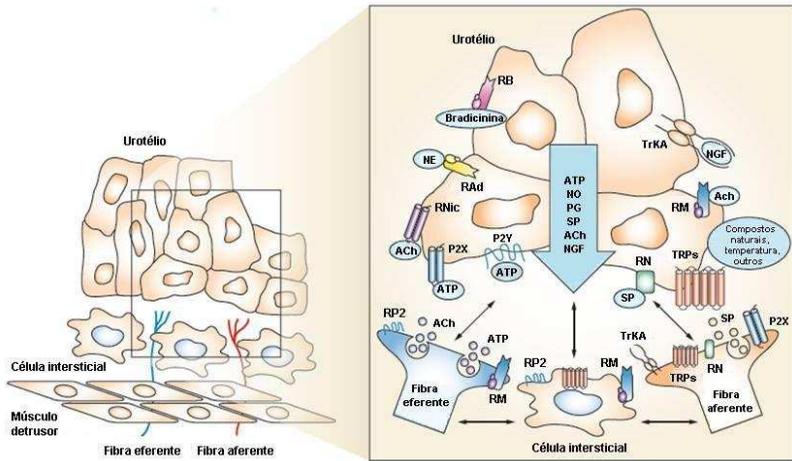


Figura 2. Interações químicas entre células uroteliais, fibras nervosas eferentes e aferentes e células intersticiais na bexiga urinária. A estimulação de receptores e canais iônicos nas células uroteliais pode causar liberação de mediadores que atingem fibras nervosas da bexiga urinária e outros tipos de células. As células uroteliais também podem ser alvo de neurotransmissores liberados de fibras nervosas ou de outros tipos de células. ATP: adenosina trifosfato; ACh: acetilcolina; RAAd: receptor adrenérgico; RB: receptor de bradicinina; RM: receptor muscarínico; NE: noraepinefrina; NGF: fator de crescimento derivado do nervo; RN: receptor de neurocinina; RNic: receptor nicotínico; NO: óxido nítrico; RP2: receptor purinérgico; P2X e P2Y: receptores purinérgicos; PG: prostaglandina; SP: substância P; TrKA: receptor tirosina quinase A; TRPs: receptores de potencial transitório (Adaptado de Fowler et al., 2008).

1.4 Fisiopatologia do processo de micção

Devido à complexidade dos mecanismos neurais que regulam o processo de micção, este é sensível a lesões ou doenças que acometem o sistema nervoso bem como a medicamentos e transtornos em órgãos periféricos, que podem produzir disfunções no esvaziamento da bexiga urinária (Abrams et al., 2002). Entre estas disfunções podemos destacar a hiperatividade urinária, uma síndrome caracterizada por contrações do músculo detrusor durante a fase de enchimento do órgão, que provoca sintomas de urgência (quando o mecanismo sensorial está intacto), noctúria, frequência e eventualmente incontinência urinária. A presença de incontinência urinária dependerá da extensão do acometimento do esfíncter uretral (Ouslander, 2004).

Apesar dos avanços na pesquisa científica nesta área, a fisiopatologia da hiperatividade da bexiga urinária permanece pouco compreendida. Esta síndrome é tradicionalmente classificada de acordo com a sua etiologia, podendo ser de origem neurogênica (por exemplo, lesão medular), miogênica (por exemplo, obstrução e hiperplasia prostática benigna), inflamatória (cistite intersticial) ou idiopática (sem etiologia definida) (Steers, 2002; Semins e Chancellor, 2004). A causa da hiperatividade urinária de origem neurogênica envolve a sensibilização de nervos aferentes da bexiga urinária ou danos nas vias inibitórias que normalmente inibem o reflexo de esvaziamento da mesma. Por outro lado, a causa da hiperatividade urinária de origem miogênica envolve mudanças no músculo detrusor devido a fatores como acidose, hipóxia ou mudanças estruturais como hipertrofia muscular que alteram seu mecanismo contrátil (Steers, 2002). A causa da hiperatividade urinária de origem inflamatória é desconhecida, mas algumas teorias a atribuem à disfunção do urotélio, inflamação neurogênica, ativação mastocitária, infecção ou autoimunidade (Bouchelouche e Nordling, 2003).

Apesar das diferentes etiologias, a hiperatividade urinária apresenta sinais característicos como aumento súbito na pressão intravesical com baixos volumes de urina durante a fase de enchimento, aumento da atividade fásica espontânea, contrações tetânicas (contrações musculares sustentadas sem intervalos de relaxamento), responsividade alterada a estímulos e mudanças na estrutura do músculo detrusor (Steers, 2002).

1.5 Efeito da lesão medular sobre o reflexo de micção

Na prática clínica, a maioria dos pacientes com lesão medular apresenta algum grau de disfunção urinária. A lesão medular acima do nível lombar interrompe o controle voluntário e as vias reflexas normais que coordenam o funcionamento do trato urinário inferior. Devido a este processo, a bexiga urinária torna-se inicialmente arreflexa (incapacidade do órgão em responder a estímulos), resultando em retenção completa da urina. A recuperação do funcionamento da bexiga urinária envolve a reorganização das vias reflexas de micção no sistema nervoso central e periférico, a qual promove o desenvolvimento lento e progressivo do processo de micção e o estabelecimento de hiperatividade da bexiga urinária (Fam et al., 1988; de Groat, 1995; Chancellor e Blaivas, 1996; de Groat et al., 1997).

Após a lesão medular, as funções do trato urinário inferior são moduladas pela atividade nervosa aferente induzida pela distensão da bexiga urinária e pelos reflexos da bexiga urinária e da uretra (Tai et al., 2006). O reflexo gerado a partir da bexiga urinária pode desencadear contrações do músculo detrusor, mesmo com volumes pequenos de urina. Quando o volume de urina aumenta, os reflexos da bexiga urinária induzem o músculo detrusor a gerar maior pressão intravesical e desencadear a micção (Iwatsubo et al., 1999). Entretanto, as fibras aferentes da bexiga urinária podem induzir concomitantemente as fibras eferentes do nervo podendo a contrair o esfíncter uretral externo, causando a dissinergia vésico-esfincteriana e o bloqueio do esvaziamento vesical (de Groat et al., 1993; Iwatsubo et al., 1999; Chancellor et al., 1999). Este processo não é revertido devido à perda do impulso inibitório do cérebro causada pela lesão medular, o qual seria necessário para relaxar o esfíncter uretral externo e permitir o escoamento da urina.

A Figura 3 mostra registros típicos de cistometrogramas da bexiga urinária e eletromiogramas do esfíncter uretral, que permitem uma comparação do reflexo de micção entre indivíduos normais e paraplégicos.

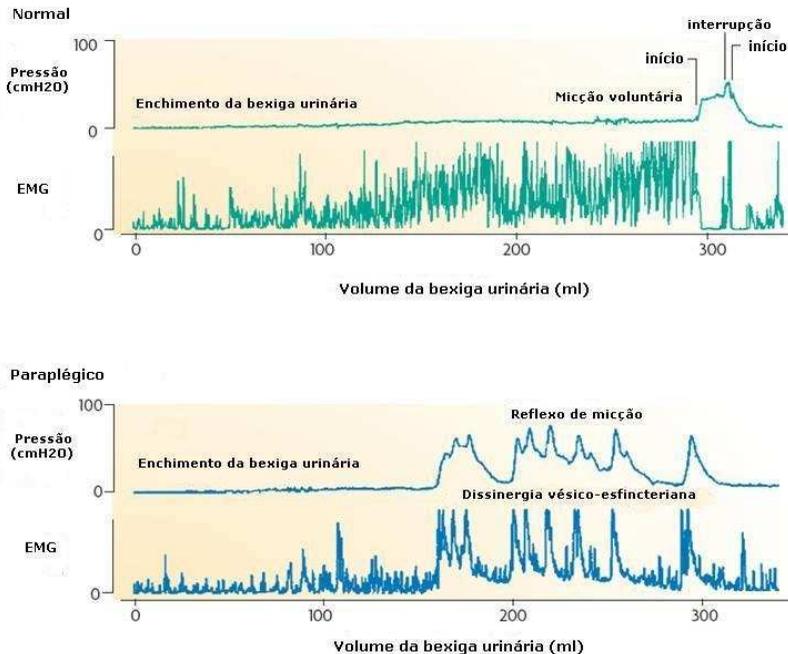


Figura 3. Reflexo de micção em indivíduos normais e indivíduos paraplégicos. O painel superior mostra o início do relaxamento do esfíncter uretral, o qual precede a contração da bexiga urinária em poucos segundos, como indicado em “início”. Notar que a interrupção do esvaziamento da bexiga urinária, como indicado em “interrupção”, é associada com o aumento na pressão do esfíncter uretral e do músculo detrusor. A retomada do esvaziamento é associada com o relaxamento do esfíncter e decréscimo na pressão do músculo detrusor. Por outro lado, em pacientes paraplégicos (painel inferior) a coordenação entre o músculo detrusor e o esfíncter uretral é abolida. Durante a fase de enchimento, contrações involuntárias da bexiga urinária (hiperatividade) ocorrem em associação com a atividade do esfíncter uretral. Cada contração da bexiga urinária é acompanhada por contração simultânea do esfíncter uretral (dissinergia vésico-esfíncteriana), o que retarda o fluxo de urina. Deste modo, a perda da coordenação entre a bexiga urinária e o esfíncter uretral em pacientes lesionados interfere com a eficiência no esvaziamento da bexiga urinária. EMG: eletromiograma (Adaptado de Fowler et al., 2008).

Portanto, após a lesão medular a bexiga urinária não apresenta boa capacidade de armazenamento de urina, propiciando a incontinência urinária devido à hiperexcitabilidade do órgão. Ao mesmo tempo, o esvaziamento urinário não é eficiente devido à dissinergia vésico-esfíncteriana. O volume residual na bexiga urinária e a necessidade de cateterização uretral para facilitar o esvaziamento vesical causam infecções urinárias recorrentes nos pacientes lesionados. A alta pressão intravesical devido ao grande volume residual induz vários problemas

urológicos como refluxo vésico-ureteral (fluxo retrógrado de urina em direção aos ureteres), hidronefrose (dilatação renal), nefrolitíase (cálculo renal) e insuficiência renal (Fam et al., 1988; Chancellor e Blaivas, 1996).

1.6 Neuroplasticidade das vias aferentes da bexiga urinária

Após um insulto neurológico ou inflamatório, as fibras C sofrem notável neuroplasticidade, caracterizada por mudanças nas conexões sinápticas centrais e alterações nas propriedades dos receptores presentes nos terminais aferentes. Estas alterações levam à sensibilização dessas fibras, antes quiescentes, tornando-as hiperexcitáveis e contribuem para o surgimento de respostas a estímulos mecânicos (de Groat, 1995).

A dissinergia vésico-esfincteriana estabelecida após a lesão medular torna o esvaziamento da bexiga urinária ineficiente, favorecendo o acúmulo de volume urinário e consequentemente a distensão excessiva do órgão. A sobrecarga mecânica sobre a bexiga urinária, como resposta compensatória desencadeia importantes mudanças estruturais na parede vesical, capazes de alterar as propriedades das fibras nervosas aferentes (Yamaguchi, 2004). Entre as mudanças estruturais podemos destacar a hipertrofia das células musculares da bexiga urinária. Estudos sugerem que o aumento na massa muscular da bexiga urinária induz alterações morfológicas nos neurônios aferentes, representadas pelo aumento no diâmetro celular e hipertrofia neuronal (Kruse et al., 1995). O estresse mecânico sobre a bexiga urinária também provoca mudanças fisiológicas nos neurônios aferentes, como o aumento da excitabilidade neuronal pela regulação da expressão de canais de sódio sensíveis e resistentes à tetrodotoxina (Yoshimura e de Groat, 1997b). Além disso, a hipertrofia muscular e a isquemia da bexiga urinária decorrentes da obstrução do órgão após a lesão medular podem desencadear a morte neuronal (Steers, 2002).

O mecanismo relacionado às mudanças nas propriedades dos neurônios aferentes da bexiga urinária ou na transmissão sináptica após a lesão medular pode envolver fatores neurotróficos produzidos e liberados na bexiga urinária ou na medula espinhal e transportados retrogradamente para o corpo celular neuronal (de Groat, 2006). A lesão medular em ratos provoca aumento nos níveis do fator de crescimento derivado do nervo (NGF), do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), das neurotrofinas 3 e 4 (NT3 e 4) na bexiga urinária, de NGF no fluido

cerebroespinal e de NGF e BDNF na medula espinhal (Vizzard, 2000; Seki et al., 2002). Além disso, a administração intravesical ou intratecal de NGF induz hiperatividade urinária (Yoshimura et al., 2006; Zvara e Vizzard, 2007).

Experimentos eletrofisiológicos realizados em neurônios do GRD (segmentos medulares L6-S1) mostram aumento na excitabilidade neuronal devido à função aumentada de canais de sódio sensíveis a tetrodotoxina, correlacionada com o aumento da sua expressão (Yoshimura e de Groat, 1997b; Black et al., 2003). O NGF altera a excitabilidade das fibras aferentes através dos canais de sódio de duas maneiras. (1) Agudamente, este fator neurotrófico pode fosforilar moléculas de sinalização que influenciam as correntes de sódio. (2) Cronicamente, o NGF modula a expressão da subunidade α no canal de sódio, o que influencia as correntes de sódio e conseqüentemente a excitabilidade das fibras aferentes (Steers e Tuttle, 2006). Esta mudança no perfil de excitabilidade dos canais de sódio pode contribuir para o aumento do reflexo espinhal, caracterizado pela diminuição do limiar para desencadear a contração do músculo detrusor.

1.7 Receptores de potencial transitório (TRP) como alvo terapêutico para a hiperatividade urinária

A possibilidade de estabelecer um alvo terapêutico para a hiperatividade urinária através da modulação das vias aferentes do reflexo de micção surgiu quando o efeito da capsaicina, um componente ativo pungente de espécies do gênero *Capsicum* (família Solanaceae) (Szallasi e Blumberg, 1999) foi estudado. A capsaicina e seu análogo resiniferatoxina, dessensibilizam as fibras aferentes C da bexiga urinária. No entanto, o efeito dessensibilizante da resiniferatoxina é até mil vezes mais potente do que o observado para a capsaicina. Este fenômeno é acompanhado por diminuição da resposta destas fibras sensoriais a estímulos naturais, incluindo a distensão vesical.

A capsaicina e a resiniferatoxina ativam um canal iônico pertencente à família de receptores TRP denominado TRPV1 (receptor de potencial transitório vanilóide 1). Todos os canais iônicos da família TRP são subunidades peptídicas com seis domínios transmembranares que normalmente se unem como tetrâmeros para formar poros. Os poros geralmente se localizam entre os domínios cinco e seis e são permeáveis a cátions de maneira não seletiva (para revisão ver Clapham, 2003; Montell, 2003). Além da ativação por compostos pungentes, o receptor TRPV1 é sensível ao pH ácido ($\leq 5,9$) e ao calor (≥ 43 °C) (Caterina et

al., 1997; Tominaga et al., 1998) e pode ser estimulado por substâncias lipídicas endógenas chamadas de endovanilóides, como a anandamida e derivados da lipooxigenase (Zygmunt et al., 1999; Hwang et al., 2000).

Na bexiga urinária de roedores e de humanos, o receptor TRPV1 é expresso em neurônios de pequeno a médio diâmetro, sendo a maioria neurônios de fibras C sensíveis à capsaicina. Dentro da bexiga urinária, essas fibras nervosas estão próximas a vasos sanguíneos e células musculares lisas e uroteliais. Assim, o receptor TRPV1 pode modular a função urotelial e a contratilidade do músculo detrusor através da liberação de neuropeptídeos contidos nessas fibras. Além disso, sua expressão foi observada em células não neuronais como as células uroteliais e intersticiais (Yiangou et al., 2001; Birder et al., 2001; Birder et al., 2002; Avelino et al., 2002; Lazzeri et al., 2004).

O interesse clínico pela aplicação intravesical de agonistas do receptor TRPV1 iniciou com as observações do pesquisador de Groat e colaboradores (1997), que sugeriam que o reflexo de micção em gatos normais e em gatos lesionados apresentava diferentes sensibilidades à capsaicina. Em gatos normais as contrações vesicais reflexas não eram alteradas por esta neurotoxina, enquanto que em gatos lesionados estas contrações podiam ser completamente suprimidas pela capsaicina. A sugestão imediata derivada destas observações foi que a micção nos gatos lesionados era controlada por um reflexo iniciado em fibras aferentes sensíveis à capsaicina. Estudos adicionais esclareceram a questão, e concluiu-se que duas vias neuronais controlam o processo de micção nos mamíferos adultos. A primeira é uma via neuronal iniciada nas fibras A δ , percorrendo os nervos pélvicos e passando através dos centros de coordenação (substância cinzenta periaquedutal e centro pontino da micção) localizados no tronco cerebral. A segunda é uma via reflexa, dirigindo-se à medula espinhal a nível sacral e iniciando-se nas fibras C. Enquanto a primeira controla a micção nos mamíferos com medulas intactas, o reflexo sacral assume o comando da micção após lesão medular, em que há interrupção das vias neuronais que ligam o centro pontino de micção à medula sacral (onde estão localizados os neurônios parassimpáticos pré-ganglionares da bexiga urinária).

Na prática clínica, o reflexo de micção incomum mediado pelas fibras aferentes C é observado em pacientes com lesão medular supra-sacral, que apresentam reflexo de esvaziamento urinário quando submetidos a um teste clínico baseado na administração intravesical de água fria (*ice water test*) seguido de avaliação cistométrica. A resposta reflexa à instilação de água fria não ocorre em indivíduos normais, mas somente em indivíduos com hiperatividade urinária decorrente de

neuropatologias como a doença de Parkinson, esclerose múltipla ou lesão medular (Geirsson et al., 1993).

A confirmação de que a inibição da atividade das fibras aferentes poderia ser benéfica no tratamento da hiperatividade urinária foi obtida através da instilação intravesical de concentrações altas de capsaicina ou de resiniferatoxina em humanos. A terapia com vanilóides reduz drasticamente o número de fibras sensoriais da bexiga urinária imunoreativas para o receptor TRPV1, substância P e CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), devido à depleção de neurotransmissores e à degeneração dos terminais nervosos periféricos na parede da bexiga urinária (Apostolidis et al., 2005; Brady et al., 2004). Quando administrada intravesicalmente, a capsaicina aumentou a capacidade de armazenamento da bexiga urinária e reduziu episódios de incontinência em pacientes com hiperatividade urinária os quais foram refratários à terapia com antimuscarínicos. A resiniferatoxina, com propriedades dessensibilizantes semelhantes à da capsaicina, apresentou efeitos similares sobre a hiperatividade urinária.

Apesar da capsaicina e da resiniferatoxina serem agonistas seletivos do receptor TRPV1 e de ambas apresentarem efeitos benéficos sobre a hiperatividade urinária, há diferenças entre esses agentes. A instilação intravesical de capsaicina é associada com sintomas agudos de queimação e dor na região suprapúbica, sendo que em pacientes com lesão medular pode precipitar crises de disreflexia autonômica (crise autonômica hipertensiva). Em contraste, os sintomas agudos associados com a instilação intravesical de resiniferatoxina são mais leves, de modo que o uso de capsaicina tem sido quase totalmente substituído pela resiniferatoxina. Além disso, a existência de uma fração significativa de pacientes que não respondem a terapia com capsaicina ou resiniferatoxina gera a necessidade de buscar novos alvos moleculares na modulação farmacológica de fibras nervosas sensoriais da bexiga urinária (Lecci e Maggi, 2005).

Estudos recentes sugerem que outro membro da família TRP, o receptor de potencial transitório com domínios tipo anquirina 1 (TRPA1) participa de diversos processos sensoriais (para revisão ver: Eidt e Cortright, 2009). Estruturalmente, o receptor TRPA1 é uma proteína com seis domínios transmembranares, com ambas as porções amino e carboxi terminal intracelulares e com múltiplos domínios relacionados à proteína anquirina na sua porção amino terminal, os quais deram origem ao seu nome. O receptor TRPA1 foi primeiramente identificado em fibroblastos de pulmão humano (Jaquemar et al., 1999), porém mais tarde este receptor foi identificado em um subgrupo de

neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) co-localizado com o receptor TRPV1 (Story et al., 2003). Neste estudo, foram identificados neurônios sensoriais sensíveis ao frio nocivo (~ 17 °C) e que também responderam à capsaicina e ao calor (~ 45 °C), caracterizando a expressão do receptor TRPA1. Entretanto, sua função como sensor de estímulo frio nocivo ainda é controversa. Além disso, o receptor TRPA1 não é expresso em neurônios altamente mielinizados, mas está presente em neurônios que contêm substância P e CGRP, sugerindo sua expressão por fibras Aδ e C sensíveis à estimulação nociva (Story et al., 2003). Além da expressão em neurônios do GRD, o receptor TRPA1 está expresso em neurônios do gânglio trigêmeo e do gânglio nodoso (Story et al., 2003; Nagata et al., 2005). Ademais, sua expressão foi descrita em células ciliadas do sistema auditivo, sugerindo a participação deste receptor na transdução mecanossensitiva das células ciliadas de invertebrados e na função auditiva (Nagata et al., 2005; Lee et al., 2006). Entretanto, esta função não foi confirmada por estudos realizados em camundongos nocautes para o receptor TRPA1, os quais não apresentaram prejuízo na função auditiva (Bautista et al., 2006; Kwan et al., 2006). Portanto, a localização do receptor TRPA1 em neurônios somatosensoriais sugere que este receptor seja um alvo para estímulos nocivos e inflamatórios, desempenhando um papel funcional na dor e na inflamação neurogênica.

Outro aspecto importante sobre o receptor TRPA1 é sua ativação por uma série de agentes pungentes usados na medicina tradicional ou substâncias contidas em especiarias e vegetais comuns na dieta alimentar, incluindo o isotiocianato de alila (óleo de mostarda), o cinamaldeído (óleo de canela), a alicina (alho), o metilsalicilato (óleo de gaultéria), o gingerol (gingibre), o eugenol (cravo), o carvacrol (orégano) e o tímol (tomilho e orégano) (Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004; Macpherson et al., 2005; Bautista et al., 2005; Xu et al., 2006). Além disso, o receptor TRPA1 pode ser ativado por produtos gerados durante o estresse oxidativo como o 4-HNE (4-hidroxinonal) e lipídeos relacionados, a acroleína, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o peroxinitrito, o ácido nitro-oléico, a 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂) e o hipoclorito (Sawada et al., 2008; Bessac et al., 2008; Andersson et al., 2008; Taylor-Clark et al., 2009). O sulfeto de hidrogênio e a acroleína, moléculas produzidas endogenamente, são também agentes exógenos tóxicos capazes de ativar o receptor TRPA1 (Bautista et al., 2006; Bessac et al., 2008; Smith, 2009).

Embora os compostos ativadores do receptor TRPA1 sejam estruturalmente distintos, estes apresentam a habilidade comum de formar adutos covalentes com grupos tióis. Todos são compostos

altamente reativos que ativam o receptor TRPA1 por reagir covalentemente com resíduos de cisteína na porção citoplasmática amino terminal do canal (Hinman et al., 2006; Macpherson et al., 2007). A identificação da importância da reatividade com o grupo tiol tem sugerido a este receptor a função de sensor para diversos agentes tóxicos do ambiente. A ativação do receptor TRPA1 por eletrófilos reativos é um componente essencial da função nociceptiva em mamíferos, provocando pungência, irritação, inflamação e dor (Baraldi et al., 2010). Neste contexto, Kang e colaboradores (2010) sugeriram que o receptor TRPA1 é um sensor antigo da percepção da dor em humanos, conservado na escala evolutiva de vertebrados e invertebrados através de 500 milhões de anos.

A expressão e a atividade do receptor TRPA1 sofrem notável plasticidade por uma série de mediadores inflamatórios ou por sua própria função intrínseca, através da ativação de vias intracelulares específicas ou transporte do receptor para a membrana celular. O receptor TRPA1 pode ser ativado e sensibilizado de modo semelhante ao receptor TRPV1 (Bandell et al., 2004; Bautista et al., 2006; Dai et al., 2007; Wang et al., 2008). Entretanto, mecanismos adicionais específicos para o receptor TRPA1 mantêm a função do canal e previnem sua dessensibilização. O comportamento nociceptivo mediado pela ativação do receptor TRPA1 pode ser sensibilizado *in vivo*, através da via de sinalização da proteína quinase A (PKA) e da fosfolipase C (PLC) (Bandell et al., 2004; Bautista et al., 2006; Wang et al., 2008) e pelo aumento da sua expressão na membrana celular após o estímulo (Schmidt et al., 2009). A translocação do receptor TRPA1 para a membrana celular representa um dos mecanismos que controlam a sua funcionalidade sob ativação aguda ou por sinais inflamatórios (Schmidt et al., 2009). A hidrólise do bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) pela ativação da PKA e da PLC são as duas principais vias que aumentam a sensibilidade do receptor TRPA1 após estímulo de receptores de bradicinina (B₂) e receptores ativados por proteinases (PAR-2) (Kang et al., 2008; Karashima et al., 2008).

Estudos prévios do nosso grupo (Andrade et al., 2006) mostram que receptor TRPA1 participa do mecanismo contrátil da bexiga urinária isolada de rato. Sua expressão foi primeiramente descrita em fibras aferentes de pequeno diâmetro inervando a bexiga urinária de camundongos (Nagata et al., 2005). Em ratos, sua expressão foi descrita em fibras nervosas não mielinizadas imunoreativas para o receptor TRPV1 inervando o urotélio, o espaço suburotelial, a lâmina muscular,

próximas a vasos sanguíneos bem como em células não neuronais como as células uroteliais da bexiga urinária (Streng et al., 2008). Na bexiga urinária de humanos, a expressão do RNAm e da proteína TRPA1 foram acentuadas no urotélio (Du et al., 2008).

O possível envolvimento do receptor TRPA1 em estados patológicos da bexiga urinária foi sugerido em estudo realizado recentemente por Du e colaboradores (2008), o qual mostrou o aumento da sua expressão na mucosa da bexiga urinária de pacientes com hiperatividade urinária causada por hiperplasia prostática benigna. Colaborando com este dado, agonistas do receptor TRPA1 quando administrados intravesicalmente, causam hiperatividade da bexiga urinária através da ativação de fibras C (Du et al., 2007; Streng et al., 2008).

Embora existam ainda poucos estudos relacionados ao receptor TRPA1 e bexiga urinária, a acentuada expressão deste receptor em fibras nervosas aferentes e em células uroteliais da bexiga urinária, sua sensibilidade térmica e também sua ativação por agentes químicos endógenos e exógenos sugerem que este receptor pode ter um papel importante na integração de processos sensoriais, fisiológicos e patológicos, da bexiga urinária. Dessa forma, buscamos avaliar a participação deste receptor na hiperatividade da bexiga urinária causada por transtorno neurológico, utilizando para isto um modelo de lesão da medula espinhal em ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar o envolvimento do receptor TRPA1 na hiperatividade da bexiga urinária induzida pela lesão medular em ratos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Padronizar o modelo de hiperatividade da bexiga urinária induzida pela lesão da medula espinhal;
- Avaliar as alterações locomotoras dos animais, bem como as alterações histopatológicas e de contratilidade da bexiga urinária decorrentes da lesão medular;
- Avaliar o efeito da lesão medular sobre a expressão dos receptores TRPA1 e TRPV1 na bexiga urinária, nos neurônios do GRD (segmentos medulares L6-S1) e na porção correspondente da medula espinhal;
- Investigar o efeito do bloqueio farmacológico *in vitro* e do bloqueio *in vivo* da síntese do receptor TRPA1 sobre a resposta contrátil mediada pelo agonista TRPA1;
- Investigar o efeito do bloqueio farmacológico *in vitro* do receptor TRPV1 sobre a resposta contrátil mediada pelo agonista do receptor TRPA1;
- Investigar o efeito do bloqueio *in vivo* da síntese do receptor TRPA1 sobre a atividade fásica espontânea da bexiga urinária;
- Investigar o efeito do bloqueio farmacológico e da síntese do receptor TRPA1 *in vivo* sobre o processo de micção;
- Avaliar a influência da lesão medular e dos fatores neurotróficos NGF e BDNF sobre a responsividade e funcionalidade dos receptores TRPA1 e TRPV1 nos neurônios do GRD (segmentos medulares L6-S1) e na porção correspondente da medula espinhal;
- Avaliar os níveis de NGF e BDNF na bexiga urinária, nos neurônios do GRD (segmentos medulares L6-S1) e na porção correspondente da medula espinhal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar machos (10 semanas de idade e peso entre 270-300 g), criados pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram alojados em grupos de 5 animais por caixa (42 x 34 x 17 cm) e mantidos em câmaras ventiladas (ALESCO[®]), a uma temperatura controlada (22 ± 2 °C), umidade entre 60 - 80% e ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com água e ração *ad libitum*. O presente estudo seguiu as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institutes of Health (NIH)* dos Estados Unidos da América (*Publication No. 85-23, revisado em 1996*). Todos os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais da UFSC (processo nº 000156).

3.2 Indução da lesão medular

O modelo de lesão medular traumática usado neste estudo foi previamente descrito por Vanický e colaboradores (2001) com algumas modificações. Inicialmente, o animal foi anestesiado pela via intraperitoneal com uma mistura 1:1 de quetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Após completa anestesia, os animais receberam antibiótico de amplo espectro (cloridrato de oxitetraciclina, 300 mg/kg i.m.). A seguir foi realizada a tricotomia e a assepsia do dorso do animal, seguido de administração subcutânea de anestésico local contendo vasoconstritor (cloridrato de lidocaína 2% + epinefrina 1:50000 - Xylestesin[®]) e incisão na área depilada no sentido rostro-caudal de aproximadamente 3 cm. O tecido gorduroso presente na região exposta foi removido. Após este procedimento, o anestésico contendo vasoconstritor foi administrado novamente por via intramuscular e os músculos que se inserem no nível das vértebras torácicas 10 a 12 foram dissecados, seguido pela remoção dos processos espinhosos. Posteriormente, a coluna espinhal foi fixada através de um fórceps.

Para acessar a medula espinhal, um pequeno orifício (1,5 mm de diâmetro) foi feito no nível da vértebra torácica 11 com o auxílio de microscópio e broca cirúrgicos. A abertura permitiu a inserção de um cateter de embolectomia Fogarty 2F (Lemaitre Catheters, Burlington, MA, EUA) diretamente no espaço epidural do canal medular, sem o rompimento da dura mater. É importante salientar que, antes de cada procedimento cirúrgico, o cateter foi calibrado através da conexão do

mesmo a uma seringa preenchida com 1 ml de água destilada. Ao pressionar o êmbolo da seringa até o volume de 100 µl, o balão existente na extremidade do cateter atingiu o diâmetro de 4,5 mm. O diâmetro do balão foi confirmado através de um paquímetro. Em seguida o balão foi desinflado e conseqüentemente o volume de água removido.

Após a calibração, o cateter foi inserido no espaço epidural e avançado aproximadamente 1 cm na direção rostral, de maneira que a extremidade do cateter contendo o balão repousou sobre a vértebra torácica 10. O cateter foi novamente inflado com 100 µl de água atingindo 4,5 mm de diâmetro, e mantido inflado com este diâmetro por um período necessário para causar o desaparecimento dos reflexos espinhais (tempo médio de 1 min). Finalizada esta etapa, o cateter foi desinflado e cuidadosamente removido. Em seguida foi realizada a sutura do músculo e da pele. Os animais falso-operados foram submetidos ao mesmo protocolo descrito acima, porém o cateter não foi inserido no espaço epidural.

Finalizado o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em ambiente aquecido. Durante 15-20 dias após a cirurgia, as bexigas urinárias dos animais lesionados foram esvaziadas manualmente, duas vezes ao dia, até o reestabelecimento da micção automática. Este procedimento foi feito aplicando-se pressão com os dedos sobre a região do abdômen acima da bexiga urinária do animal. Ainda como parte dos cuidados pós-operatórios, os animais foram mantidos em ambiente limpo e observados diariamente para evitar desconforto e infecção. Os cuidados pré e pós-operatórios seguiram o protocolo de Santos-Benito e colaboradores (2006), bem como o MASCIS (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*).

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: não-operados (sem nenhuma intervenção cirúrgica), falso-operados (intervenção cirúrgica, sem inserção do cateter) e lesionados (intervenção cirúrgica, com inserção de cateter).

3.3 Implantação de cateter intratecal

A fim de obter uma liberação intratecal sustentada de droga em alguns grupos experimentais, logo após o procedimento cirúrgico, foi feito um pequeno orifício na dura mater próximo à região da lesão para possibilitar a inserção de um cateter intratecal de poliuretano (Alzet Durect, Cupertino, CA, EUA). O cateter foi previamente preenchido com heparina (400 UI) para evitar sua obstrução. A porção final do cateter foi posicionada subduralmente no lado dorsal da medula espinhal alcançando os segmentos medulares L6-S1. A porção externa do cateter

foi fixada no músculo através de suturas. A extremidade da porção externa foi selada e deixada subcutaneamente. A seguir, o músculo e a pele foram suturados. O mesmo procedimento para implantação do cateter intratecal foi feito em animais falso-operados.

Para avaliar o efeito do tratamento intratecal com antisense oligodeoxinucleotídeo (AS-ODN: 5'-TCTATGCGGTTATGTTGG-3'; 0,5 nmol/μl) ou com missense oligodeoxinucleotídeo (MS-ODN 5'-ACTACTACACTAGACTAC-3'; 0,5 nmol/μl) para o TRPA1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) sobre as atividades fásica espontânea e contrátil da bexiga urinária e sobre os parâmetros urodinâmicos, os animais foram submetidos a dois protocolos experimentais. No primeiro protocolo, 7 dias após a cirurgia, os animais foram anestesiados com isoflurano (2%) e uma pequena incisão na região da sutura localizada no dorso do animal foi realizada para permitir a visualização da extremidade do cateter. A seguir, uma bomba osmótica (Alzet type 2001), que opera a uma taxa de 1 μl/hr por um período de 7 dias, previamente preenchida com AS-ODN ou MS-ODN TRPA1 foi acoplada ao cateter. A bomba osmótica foi posicionada subcutaneamente entre as omoplatas do animal. Os animais foram sacrificados 7 dias após a implantação da bomba osmótica, ou seja, 14 dias após o procedimento cirúrgico e as atividades fásica espontânea e contrátil da bexiga urinária foram avaliadas *in vitro*.

No segundo protocolo experimental, 14 dias após a cirurgia, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento experimental descrito acima para possibilitar a visualização do cateter intratecal. A seguir, uma bomba osmótica (Alzet type 2002), que opera a uma taxa de 0,5 μl/hr, por um período de 14 dias, previamente preenchida com AS-ODN ou MS-ODN TRPA1 foi acoplada ao cateter. Os parâmetros urodinâmicos foram avaliados 14 dias após a implantação da bomba osmótica, ou seja, 28 dias após a cirurgia.

3.4 Avaliação da atividade locomotora dos animais

Para avaliar a recuperação funcional dos membros inferiores dos animais após a lesão medular, foi realizado teste comportamental que segue a escala desenvolvida por Basso e colaboradores (1995), denominada escala BBB. Esta escala varia de 0 a 21 e os principais escores são: 0, nenhum movimento dos membros inferiores; 1, movimentos leves de uma ou duas articulações; 4, movimentos leves de todas as três articulações; 7, movimento de extensão das três articulações; 10, suporta ocasionalmente o peso sobre as patas traseiras; 21, atividade locomotora normal. Para a realização do teste

comportamental, os animais foram primeiro adaptados no campo aberto. O teste foi realizado a cada dois dias do dia 0 ao dia 28 após o procedimento cirúrgico por um período de 15 minutos.

3.5 Análise histopatológica da bexiga urinária

A análise histopatológica da bexiga urinária foi realizada em animais não-operados, falso-operados e lesionados nos períodos de 2, 7, 14 e 28 dias após o procedimento cirúrgico, baseada nos seguintes critérios: desenvolvimento de hipertrofia tecidual, análise histológica e quantificação indireta da resposta inflamatória.

Inicialmente, para avaliar a presença de hipertrofia tecidual, os animais foram sacrificados por overdose de pentobarbital de sódio (100 mg/kg, i.p.). As bexigas urinárias foram removidas e o peso úmido de cada amostra foi obtido como indicativo da ausência ou presença de hipertrofia tecidual. Posteriormente, para a análise histológica, os animais foram anestesiados e perfundidos com solução de PBS (solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH 7,2 a 7,4) e paraformaldeído 4% nos mesmos períodos descritos acima. Após a perfusão dos animais, as bexigas urinárias foram removidas, fixadas em paraformaldeído 4% por 48 h e desidratadas em etanol 70% por 24h, ambas as etapas em temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram emblocadas em parafina, seccionadas (espessura de 5 µm) e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para posterior avaliação microscópica.

Finalmente, o recrutamento de neutrófilos para a bexiga urinária foi quantificado indiretamente através da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), segundo método descrito por Souza e colaboradores (2000) com algumas modificações. Para tal, após o sacrifício dos animais, as bexigas urinárias foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C. As amostras foram homogeneizadas a 5% (peso/volume) em tampão EDTA/NaCl (pH 4,7) e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min a 4 °C. O precipitado resultante foi ressuspensão em tampão 1 gelado (pH 7,4; NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M e NaEDTA 0,015 M). Adicionou-se então NaCl 0,2% gelado e, após 30 s, NaCl 1,6% contendo glicose 5% (gelado). A solução foi centrifugada a 10.000 rpm, por 15 min a 4 °C. O precipitado formado foi ressuspensão em tampão 2 gelado [pH 5,4; NaPO₄ 0,5 M e hexadeciltrimetilamônio (H-TAB) 0.5%] e as amostras obtidas foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido. Após o último descongelamento, as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm, por 15 min a 4 °C, e 25 µl do sobrenadante foram usados para o ensaio de MPO. A reação enzimática foi feita na presença de

tetrametilbenzidina (TMB; 1,6 mM), NaPO_4 (80 mM) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2 ; 0,3 mM). A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 690 nm e os resultados foram expressos em densidade óptica (DO)/mg de tecido.

3.6 Bexiga urinária isolada de rato

Após a laparotomia, a bexiga urinária foi rapidamente removida e transferida para uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit (composição mM: NaCl 119,0; KCl 4,7; MgSO_4 1,5; CaCl_2 2,5; NaHCO_3 25,0; KHPO_4 1,2 e glicose 11,0; pH 7,4). A bexiga urinária foi seccionada longitudinalmente em quatro partes de aproximadamente 10 mm de comprimento e 3 mm de largura e tanto o tecido conectivo quanto o tecido adiposo foram removidos. Em seguida cada preparação foi transferida para uma cuba de vidro contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit, aquecida a 37 °C e aerada com uma mistura de 95% de O_2 e 5% de CO_2 . As preparações foram suspensas através de dois fios de algodão, um em cada extremidade do tecido, sendo que um dos fios foi conectado a um transdutor de força (TRI-201; Letica Scientific Instruments, Barcelona, Espanha) e o outro preso a uma haste de plástico. As preparações foram inicialmente submetidas a uma tensão basal de 1 g, seguido por um período de equilíbrio de 60 min. Durante este período, a solução de Krebs-Henseleit foi renovada a cada 15 min e a tensão basal ajustada novamente para 1 g nos primeiros 10 min. As mudanças de tensão isométrica foram registradas em polígrafo (TRI-201; Letica Scientific Instruments).

3.7 Avaliação da contratilidade da bexiga urinária isolada a estímulos exógenos

Decorrido o período de equilíbrio, as preparações foram expostas ao cinamaldeído (300 μM), capsaicina (0,1 μM), carbacol (0,1 μM) ou KCl (80 mM). Atingido o ponto de estabilidade das respostas contráteis tônicas para cada substância, a solução de Krebs-Henseleit foi renovada 4 vezes, seguido por um período de repouso de 15-20 min entre as exposições. A escolha da concentração de cada droga foi selecionada a partir de estudos prévios (Calixto, 1995; Andrade et al., 2006). As respostas contráteis da bexiga urinária de animais não-operados, falso-operados e lesionados a diferentes estímulos foram analisadas nos períodos de 2, 7, 14 e 28 dias após a cirurgia. Em outro grupo de animais não-operados, a avaliação da participação das células uroteliais na resposta contrátil mediada por alguns dos agonistas mencionados acima, foi feita através da remoção da camada urotelial

presente em cada preparação pela fricção leve do tecido com haste de algodão.

Em outra série experimental, foi avaliado o efeito do antagonismo *in vitro* dos receptores TRPA1 e TRPV1 sobre a resposta contrátil mediada pela ativação do receptor TRPA1. Para isso, as bexigas urinárias de animais lesionados e falso-operados foram removidas 14 dias após o procedimento cirúrgico, e isoladas de acordo com o protocolo descrito acima. Após o período de estabilização, as preparações foram incubadas por 20 min com o HC-030031 (antagonista TRPA1: 10, 30, 60 ou 100 μM) ou com o SB-366791 (antagonista TRPV1: 10, 30, 100 ou 300 μM), sendo apenas uma concentração de cada droga testada por preparação, seguido pela exposição ao cinamaldeído (300 μM). Além disso, o efeito da regulação da síntese do receptor TRPA1, através do tratamento *in vivo* com AS-ODN TRPA1, durante 7 dias, sobre a atividade fásica espontânea e a resposta contrátil induzida pelo cinamaldeído foram avaliadas em bexigas urinárias isoladas de animais lesionados e falso-operados.

As respostas contráteis obtidas em todos os experimentos foram expressas como g de tensão.

3.8 Avaliação urodinâmica através da cistometria

Com o objetivo de aprofundar o estudo acerca da participação do receptor TRPA1 na hiperatividade urinária, o processo miccional dos animais falso-operados e lesionados foi avaliado através da análise dos parâmetros urodinâmicos utilizando a técnica de cistometria. Este protocolo experimental foi realizado no 28º dia após o procedimento cirúrgico, pois neste período os animais lesionados apresentaram restabelecimento parcial do processo de micção.

Sob anestesia intraperitoneal com uretano (0,9 g/kg para animais lesionados e 1,2 g/kg para animais falso-operados) um cateter de polietileno (PE-60; Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) foi inserido através de uma pequena incisão feita no corpo da bexiga urinária. O cateter intravesical foi conectado por meio de uma torneira de três vias a um transdutor de pressão (ADInstruments, Castle Hill, Austrália) para registrar a pressão intravesical e à uma bomba de infusão (Insight Equipamentos Científicos, São Paulo, Brasil) para permitir a infusão contínua de salina para o interior da bexiga urinária. A pressão intravesical foi registrada continuamente usando um programa de aquisição de dados (PowerLab 8/30; ADInstruments). Após a implantação do cateter, os animais foram mantidos aquecidos e em repouso durante 30-60 min para a estabilização da bexiga urinária. Após

este período, a bexiga urinária dos animais receberam a infusão contínua de salina (NaCl, 37 °C) a uma taxa de 0,1 ml/min.

Os parâmetros cistométricos avaliados foram: pressão de micção (PM, pressão intravesical máxima durante a micção), pressão basal (PB, menor pressão intravesical entre as micções), pressão limiar (PL, pressão intravesical imediatamente antes da micção) e intervalo entre as contrações (IC). A amplitude e o número de contrações não associadas à micção (CNMs) também foram avaliadas. Baseado em estudo prévio realizado por Ogawa e colaboradores (2008), as CNMs foram definidas como a pressão intravesical rítmica maior que 5 mmHg (aproximadamente 7 cmH₂O) em relação à pressão basal sem a liberação de salina da uretra.

O volume de salina eliminado pela uretra (VE) foi coletado e medido. A fim de determinar o volume residual (VR), a infusão de salina foi interrompida no início de uma contração de micção e o VR medido pela retirada de salina através do cateter intravesical e pelo esvaziamento do conteúdo intravesical pela pressão manual sobre a bexiga urinária. A capacidade da bexiga urinária (CBU) foi calculada como a soma do VE e do VR. A eficiência no esvaziamento vesical (EEV) foi estimada em porcentagem, de acordo com a equação: $EE = [(VE/CBU) \times 100]$.

Os parâmetros urodinâmicos foram calculados a partir de ciclos de micção obtidos durante 45 min. Inicialmente, foram comparados os ciclos de micção de animais falso-operados e lesionados. Posteriormente, nos grupos experimentais em que o efeito do antagonista TRPA1, o HC-030031 (30 mg/kg, i.v. caudal) ou do veículo (DMSO 8% e Tween 80 2%, i.v. caudal) foi investigado, ciclos de micção foram registrados antes (usados como valores basais) e depois da administração do antagonista. Quando o efeito do tratamento prévio com AS-ODN ou com MS-ODN TRPA1 foi investigado, ciclos de micção obtidos nos dois grupos experimentais foram comparados.

3.9 Extração do RNA total

Para a extração do RNA total, as amostras de bexiga urinária, gânglios da raiz dorsal (GRDs) (segmentos medulares L6-S1) e da porção correspondente da medula espinhal de animais não-operados, falso-operados e lesionados nos períodos de 2, 7, 14 e 28 dias após o procedimento cirúrgico, foram coletadas e rapidamente colocadas em TRizol[®] (Invitrogen) na proporção de 1 ml do reagente para cada 100 mg de tecido. Os tecidos foram homogeneizados com triturador automático para obtenção do homogenato. Ao homogenato foram

adicionados 200 µl de clorofórmio, sendo este posteriormente submetido à agitação e centrifugação (12.000 x g, 15 min, 4 °C). A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 500 µl de álcool isopropílico. O conteúdo do tubo foi misturado por inversão e posteriormente mantido em repouso em temperatura ambiente por 10 min. A mistura foi centrifugada (12.000 x g, 15 min, 4 °C), sendo o pellet resultante re-suspensão em 1 ml de etanol 75% gelado. Após centrifugação (7.000 x g, 5 min, 4 °C), o pellet contendo RNA foi dissolvido em água tratada com 0,1 % de dietilpirocarbanato (DEPC), sendo a concentração e a pureza determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 1100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). O RNA foi aliquoteado e estocado a -70 °C até o momento do uso. Após a obtenção do RNA, foi realizado o ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) como descrito abaixo.

3.10 Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real)

Com o objetivo de determinar o efeito da lesão medular sobre os níveis de RNAm codificador da proteína TRPA1, foi realizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real time-PCR*). Para a reação da transcrição reversa, foi utilizada a enzima *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) (Invitrogen). Amostras de bexiga urinária, GRDs e medula espinhal contendo 2 µg de RNA total foram incubadas com 1 µg de oligo dT (500 µg/ml), 1µl de dNTPs mix (10 mM) e água ultra pura para um volume final de 12 µl. Para a obtenção do DNA complementar (DNAc) as amostras foram aquecidas a 65 °C por 5 min, resfriadas a 4 °C por 5 min para a adição de 4 µl de tampão de primeira fita [250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl e 15 mM MgCl₂], 2µl de DTT (0,1 M) e 1 µl de inibidor de RNase. A mistura foi incubada a 37 °C por 2 min e 1µl da enzima M-MLV (200U) foi adicionada. Após a adição da enzima, as amostras foram mantidas a 37 °C por 50 min e a reação foi inativada a 75 °C por 15 min. O DNAc foi estocado a 4 °C até a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação de PCR foi realizada para promover a amplificação do DNAc para o TRPA1 e para a β-actina. Para tal, o DNAc foi amplificado em duplicata utilizando o kit Master Mix TaqMan® Universal PCR (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil), com primers específicos para ratos, com marcação 3'quencher MGB e FAM, para o TRPA1 (Rn01473803_m1) e 3'quencher MGB e VIC para o controle endógeno β-actina ACTB (Rn00667869_m1) (Applied Biosystems). A reação de

PCR foi realizada em uma placa de reação óptica de 96 poços (Applied Biosystems). Cada reação continha: 1 µl de DNAC (300 ng), 5 µl de Master Mix (2x), 0,5 µl de primer (sonda Taqman) e 3,5 µl de água ultrapura, em um volume final de 10 µl. As amplificações foram realizadas em um termociclador (StepOne Plus; Applied Biosystems) para 55 ciclos. Os parâmetros do termociclador foram os seguintes: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 55 ciclos de 95 °C por 15 s, e 60 °C por 1 min. A fluorescência foi coletada a cada ciclo de amplificação e os dados foram analisados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para a quantificação relativa (QR). A expressão do gene alvo foi calibrada contra condições encontradas em animais controle.

3.11 Preparo dos cortes histológicos e reativação antigênica

A análise de imuno-histoquímica da expressão dos receptores TRPA1 e TRPV1 foi realizada 2, 7, 14 e 28 dias após o procedimento cirúrgico em amostras de bexiga urinária, GRDs (segmentos medulares L6-S1) e porção correspondente da medula espinhal de animais não-operados, falso-operados e lesionados. Além disso, a expressão do receptor TRPA1 foi avaliada em outras amostras dos tecidos, obtidas de animais lesionados tratados com AS-ODN ou MS-ODN TRPA1 durante 14 dias. Para a execução do protocolo, as amostras foram coletadas após perfusão dos animais com solução PBS e paraformaldeído 4%, fixadas e desidratadas como descrito anteriormente para a realização da análise histológica. Os cortes teciduais (espessura de 5 µm) foram montados sobre lâminas preparadas com solução de ATPS (3-aminopropiltriétoxissilano) a 5% em acetona PA, sendo mantidas em estufa a uma temperatura de 50 °C durante 1 h para fixação dos cortes. Após a fixação, os cortes foram desparafinados em cubas de vidro contendo xilol e re-hidratados por passagens sucessivas em etanol em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, 80% e 70%). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar reações inespecíficas falso-positivas. Dessa maneira, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 1,5 % em metanol absoluto (v/v) por 20 min, com posterior lavagem com água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, foi preparada uma solução composta por 180 ml de ácido cítrico 0,1 M e 820 ml de citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0). A seguir, as lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída

1:10 em água destilada e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98 °C, durante 40 min. Logo após, ainda como parte do processo térmico de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente e lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, estas foram submersas em solução PBS.

3.12 Detecção imunológica

A imunodeteção dos receptores TRPA1 e TRPV1 foi realizada utilizando os anticorpos policlonais de coelho anti-TRPA1 (1:100; Abcam, Cambridge, MA, EUA) ou anti-TRPV1 (1:750; Abcam) diluído em líquido diluente para anticorpos (Novocastra[®]; Leica Microsystems, Bannockburn, IL, EUA). A solução contendo o anticorpo foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2-8 °C, durante 12-16 h. A seguir, as lâminas foram lavadas com solução PBS à temperatura ambiente. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado apropriado (1:250; DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA) em câmara úmida durante 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens utilizando-se solução PBS por 5 min e os cortes teciduais foram incubados com estreptavidina-peroxidase (1:250; Invitrogen) por 1 h em temperatura ambiente. As amostras foram submetidas à revelação colorimétrica através de uma solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) e 0,3% de peróxido de hidrogênio.

Após a revelação colorimétrica, foi realizada a contra coloração das lâminas com solução de hematoxilina, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em Entellan[®] (Merck, São Paulo, SP, Brasil). Para cada reação foi utilizado um controle negativo, que consistiu da exposição dos cortes teciduais ao anticorpo secundário na ausência de anticorpo primário. As imagens foram captadas através de microscópio óptico (Eclipse 50i; Nikon, Melville, NY, EUA) e câmera digital (DS-Fi1; Nikon) acoplados. Para cada corte de tecido foram obtidas de 4-5 imagens. As imagens digitalizadas foram transferidas para o computador e a intensidade média da marcação para o receptor TRPA1 ou TRPV1 foi determinada para cada imagem através do programa *NIH ImageJ 1.36b* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) e os resultados expressos em unidade arbitrária. Para avaliar a diferença de expressão do receptor TRPA1 entre o urotélio e músculo detrusor, as imagens de

bexiga urinária foram digitalizadas, a área específica de cada tecido foi delimitada, a intensidade da imunoreatividade para cada área foi medida e os valores obtidos foram divididos pela área. Os resultados foram expressos em unidade arbitrária/área do tecido.

3.13 Cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal

Quatorze dias após o procedimento cirúrgico, GRDs (segmentos medulares L6-S1) de animais não-operados, falso-operados e lesionados foram removidos para a realização da cultura primária. Após a remoção, os GRDs foram colocados separadamente em placa de Petri contendo tampão HBSS (solução salina tamponada com HEPES) gelado, sem cálcio e magnésio, contendo (mM): NaCl 140, KCl 2,5, HEPES 10, pH 7,4. Após a remoção dos tecidos conectivos, os GRDs foram colocados em um tubo contendo papaína 0,1% (p/v) a 37 °C por 20 min. Após este período, a amostra foi centrifugada (1 min, 200 x g). Ao precipitado foi adicionado colagenase tipo 1A 0,25%, mantido a 37 °C por 20 min, seguido de nova centrifugação (1 min, 200 x g). Após a digestão enzimática, os GRDs foram lavados com tampão HBSS sem cálcio e magnésio e ressuspensos em 3 ml de DMEM (Dulbecco's modified Eagle) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativo por calor e 1% de penicilina/estreptomicina. Após nova centrifugação (1 min, 200 x g), o precipitado resultante foi novamente ressuspensionado em DMEM. A seguir, os GRDs foram dissociados mecanicamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

Os neurônios foram depositados sobre lamínulas de vidro (45 mm de diâmetro) previamente tratadas com poli-lisina e laminina (ambas 20 µg/ml) e então colocadas sobre placas de Petri (60 mm de diâmetro) adicionadas de 2,5 ml de meio de cultura DMEM. Nesta etapa, as células neuronais foram incubadas na presença ou na ausência do fator de crescimento derivado do nervo 2.5s (NGF 100 ng/ml) ou do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF 100 ng/ml). As concentrações dos fatores neurotróficos utilizadas foram obtidas de um estudo prévio realizado por Kerekes e colaboradores (2000). As células foram mantidas em cultura por um período de 18-24hs a 37 °C em atmosfera saturada de umidade com 5% de CO₂.

3.14 Ensaio de mobilização de cálcio

O ensaio de mobilização de cálcio foi realizado como descrito previamente por Gomes e colaboradores (2004). As células cultivadas foram incubadas com um marcador de cálcio, o fluoróforo Fluo 4-AM (3 mM) por 30 min em tampão HBSS contendo (mM): NaCl 124, KCl

4, CaCl_2 1, MgCl_2 1.2, glicose 10, HEPES 25, pH 7,4. A seguir, as células foram lavadas com tampão HBSS e as lamínulas transferidas para um sistema de perfusão (Bioptechs, Butler, PA, EUA), que foi posicionado ao microscópio confocal de varredura a laser SP5 (Leica Microsystems). A solução HBSS (com ou sem agonista) foi perfundida continuamente (0,6 ml/min) através de uma mini bomba peristáltica (Bioptechs) simultaneamente à captação das imagens pelo microscópio com objetiva de imersão de água 20x e análise pelo programa *Leica Application Suite* (LAS). O fluoróforo foi excitado com laser de argônio no comprimento de onda de 488 nm e a luz emitida foi captada em banda de emissão de 510-570 nm.

Os neurônios foram estimulados com tampão HBSS contendo capsaicina (1 μM) ou cinamaldeído (300 μM). A escolha da concentração de cada droga foi selecionada a partir de estudos prévios (Bleakman et al., 1990; Andrade et al., 2006). Os sinais fluorescentes de cálcio obtidos após a exposição aos estímulos foram registrados continuamente, em intervalos de 1 s, durante 10 min. Para avaliar a viabilidade celular, os neurônios foram estimulados com KCl (30 mM) 10 min após o estímulo com o agonista. Os neurônios do GRD de pequenos diâmetro (< 25 μm) e responsivos à capsaicina ou ao cinamaldeído (aumento de fluorescência igual ou superior a 50% do nível basal de fluorescência) foram considerados para a análise.

Os campos de interesse foram identificados e delimitados pela área de todo o corpo celular. Nesses campos a intensidade de fluorescência foi quantificada ao longo do tempo, usando o programa LAS. As mudanças na fluorescência (F) foram normalizadas pela fluorescência inicial (F_0) para cada região de interesse e foram expressas como $(F/F_0) \times 100$ (% relativa ao basal). Os valores de fluorescência obtidos no decorrer do tempo foram representados como a média das células estudadas em vários experimentos. A amplitude média das mudanças na mobilização de cálcio representa a diferença entre o basal e o pico transitório de fluorescência em resposta à capsaicina ou ao cinamaldeído.

3.15 Dosagem de fatores neurotróficos

Amostras de bexiga urinária, GRDs (segmentos medulares L6-S1) e porção correspondente da medula espinhal foram removidas de animais não-operados, falso-operados e lesionados nos períodos de 2, 7, 14 e 28 dias após a cirurgia, para avaliar possíveis alterações decorrentes da lesão medular nos níveis dos fatores neurotróficos NGF (fator de crescimento neuronal) e BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro).

Para tal, os tecidos foram homogeneizados em solução PBS contendo Triton X (0,05%), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,1 mM, cloreto de benzametônio 0,1 mM, EDTA 10 mM, pepstatina A 0,1 µg/ml e aprotinina A 2 ng/ml. O homogenato foi centrifugado a 3.000 x g por 15 min, 4 °C). O sobrenadante foi separado e estocado a -70 °C até o momento do uso. Os níveis de NGF e BDNF foram quantificados através de imunoenensaio enzimático (ELISA) de acordo com as instruções dos fabricantes (NGF: R&D System, Minneapolis, MN, EUA; BDNF: Chemicon, Temecula, CA, EUA). A dosagem de proteínas nas amostras foi realizada segundo o método de Bradford (1976). Os resultados foram expressos em pg/mg proteína.

3.16 Drogas e reagentes

As seguintes drogas e reagentes foram usados: cinamaldeído, capsaicina, carbacol, pentobarbital de sódio, uretano, 3-aminopropiltriethoxisilano, colagenase tipo 1A, poli-lisina, laminina, papaína, penicilina/estreptomicina e BDNF provenientes da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), SB-366791 da Tocris (St. Louis, MO, EUA), cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina[®]) da Pfizer (São Paulo, SP, Brasil), cloridrato de lidocaína + epinefrina (Xylestesin[®]) da Cristália (Itabira, SP, Brasil), quetamina (Francotar[®]) e xilazina (Virbaxyl[®]) da Virbac (São Paulo, SP, Brasil), heparina sódica (Liquemine[®]) da Roche (Basel, Suíça), hematoxilina e eosina da Merck (Darmstadt, Alemanha), NGF da Promega (Madison, WI, EUA), soro fetal bovino da Gibco, Carlsbad, CA, EUA), DMEM e Fluo 4-AM da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). A solução de cinamaldeído foi preparada em etanol absoluto e Tween 80 (concentrações finais de ambos os reagentes não excederam 0,003%) e as soluções de carbacol e SB-366791 foram preparadas em água destilada e etanol absoluto (concentração final não excedeu 0,3%), respectivamente. O HC-030031 (pureza ≥ 98%, HPLC) foi sintetizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina como descrito pela Organização Mundial da Propriedade Intelectual (Moran et al., 2007) e solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) e Tween 80. Para os experimentos *in vitro* e *in vivo*, as concentrações finais de DMSO não excederam 0,6% e 8%, respectivamente. Os veículos usados não tiveram efeito sobre o tônus das preparações, sobre as contrações induzidas pelos agonistas ou sobre os parâmetros urodinâmicos.

3.17 Análise estatística

Os resultados são representados como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.), exceto para os valores de CI_{50} (a concentração de antagonista necessária para reduzir a resposta do agonista em 50% relativo ao valor controle), os quais são expressos como a média geométrica acompanhada pelo respectivo limite de confiança. Os valores de CI_{50} foram estimados usando quatro concentrações do antagonista, entre o efeito mínimo e o efeito máximo. As porcentagens de inibição ou de aumento são expressas como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) das inibições ou dos aumentos máximos individuais obtidos em cada experimento. A significância estatística entre os grupos foi avaliada através do teste t de Student pareado ou não pareado, teste U de Mann-Whitney, teste do Qui-quadrado ou da análise de variância (ANOVA) seguida do teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls ou Dunnett. A probabilidade aceita como indicativo de diferença estatística foi $P < 0,05$. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o programa estatístico *GraphPad 4* (GraphPad Software; San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Alterações fisiopatológicas decorrentes da lesão medular

Visando a padronização de um modelo de lesão medular que permitisse o desenvolvimento de hiperatividade da bexiga urinária, avaliou-se a severidade do trauma medular através da escala BBB para capacidade locomotora dos animais (Anexos 1 e 2). Os escores obtidos foram similares àqueles previamente observados por Vanický e colaboradores (2001), ou seja, em animais falso-operados foi observado escore 21, representativo de atividade locomotora normal dos membros anteriores e posteriores durante todo o período analisado, não diferindo da capacidade locomotora de animais não-operados. Em animais lesionados não houve alteração na atividade locomotora dos membros anteriores, mas foi observado escore 0 para os membros inferiores 2 dias após a cirurgia, atingindo um escore máximo de $3,2 \pm 0,7$ quatro semanas após a lesão medular. Segundo a escala BBB, este escore médio foi representado por movimento extenso de duas articulações dos membros posteriores (escore 3) ou movimento discreto das três articulações dos membros posteriores (escore 4), indicativo de severa paraplegia (Figura 4). Para garantir a fidedignidade e a reprodutibilidade do modelo experimental bem como o estabelecimento da hiperatividade urinária, os animais que apresentaram escore acima de 4 não foram utilizados nos experimentos subsequentes.

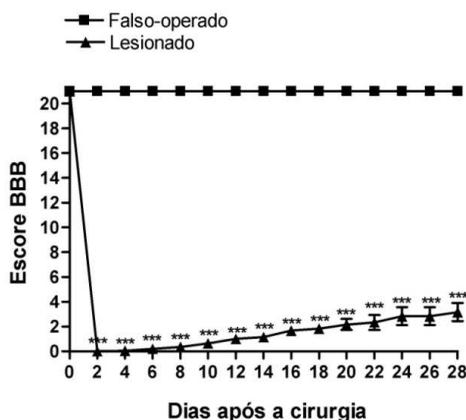


Figura 4. Atividade locomotora dos animais. A capacidade locomotora de animais falso-operados e lesionados foi avaliada durante 28 dias baseada na escala BBB. Cada ponto representa a média e as linhas verticais o e.p.m. de 6 animais. *** $P < 0,001$ comparado com o grupo falso-operado (teste U de Mann-Whitney).

4.2 Alterações histopatológicas decorrentes da lesão medular

Para detectar possíveis alterações histopatológicas decorrentes da lesão medular, realizamos a análise histológica qualitativa da bexiga urinária. Comparada à bexiga urinária de animais não-operados e falso-operados, a bexiga urinária de animais lesionados apresentou acúmulo de fibrina, edema pronunciado, alterações vasculares e redução no número de camadas de células uroteliais (Figura 5A-D). O dano na estratificação do urotélio foi severo e generalizado no 2º dia após a lesão medular (Figura 5C). No mesmo período, também foi observada a migração de neutrófilos para o tecido suburotelial (Figura 5C). A migração de neutrófilos foi validada através da medida da atividade da enzima MPO. A Figura 5E mostra a intensa migração de neutrófilos para a bexiga urinária 2 dias após a lesão medular, conforme indicado pelo aumento de aproximadamente 70 vezes na atividade da MPO, a qual retornou a valores basais nos períodos subseqüentes (7, 14 e 28 dias). Nestes períodos, as células uroteliais foram renovadas e somente alterações discretas e escassas foram notadas (Figura 5D). Entretanto, foi observado aumento duradouro no peso úmido da bexiga urinária (1,7 vezes no dia 2 e 3,5 vezes nos dias 7, 14 e 28 após a cirurgia), indicando possível desenvolvimento de hipertrofia tecidual (Figura 5F). Esses resultados mostram que a lesão medular induziu processo inflamatório agudo associado com mudanças estruturais crônicas na bexiga urinária.

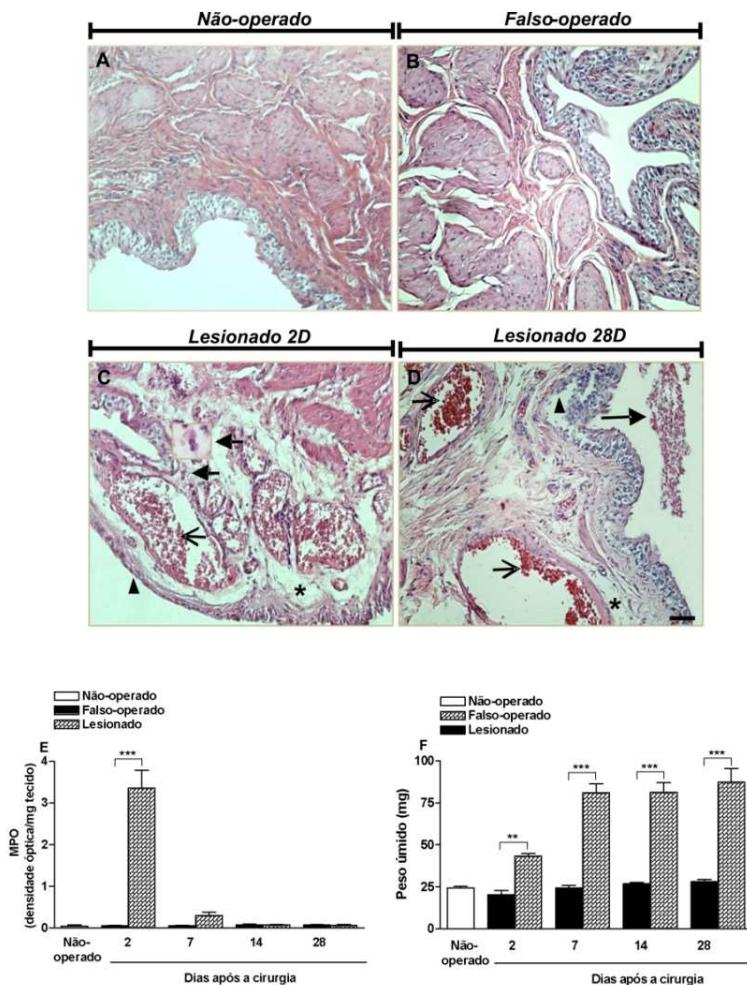


Figura 5. Alterações histopatológicas da bexiga urinária após a lesão medular. Análise histológica realizada em bexigas urinárias de animais não-operados (painel A), falso-operados (painel B) e lesionados 2 (painel C) e 28 (painel D) dias após a cirurgia mostrando dano no urotélio (cabeça de seta), infiltração de neutrófilos (seta fechada, inserção aumento de 100x), congestão e dilatação de vasos sanguíneos (seta aberta), edema (asterisco) e acúmulo de fibrina (seta longa) (coloração H&E: aumento de 20x, escala 100 μ m). Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) (painel E) e medida do peso úmido (painel F) da bexiga urinária de animais não-operados, falso-operados e lesionados coletadas 2, 7, 14 e 28 dias após a cirurgia. Cada coluna representa a média e as linhas verticais o e.p.m. de 4 animais. $^{**}P < 0,01$; $^{***}P < 0,001$ comparado com o respectivo grupo falso-operado (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

4.3 Análise dos níveis de RNAm codificador do receptor TRPA1 após a lesão medular

Os níveis de RNAm codificador do receptor TRPA1 foram avaliados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real em amostras de bexiga urinária, neurônios do GRD (segmentos medulares L6-S1) e porção correspondente da medula espinhal de animais não-operados, falso-operados e lesionados coletadas 2, 7 e 14 dias após a cirurgia. Interessantemente, 7 dias após o procedimento cirúrgico, o nível de RNAm foi maior na bexiga urinária e nos GRDs (cerca de 9 e 2 vezes, respectivamente) de animais lesionados em comparação aos animais falso-operados (Figura 6A-B). Entretanto, não houve alteração nos níveis de RNAm na medula espinhal em todos os períodos analisados (Figura 6C).

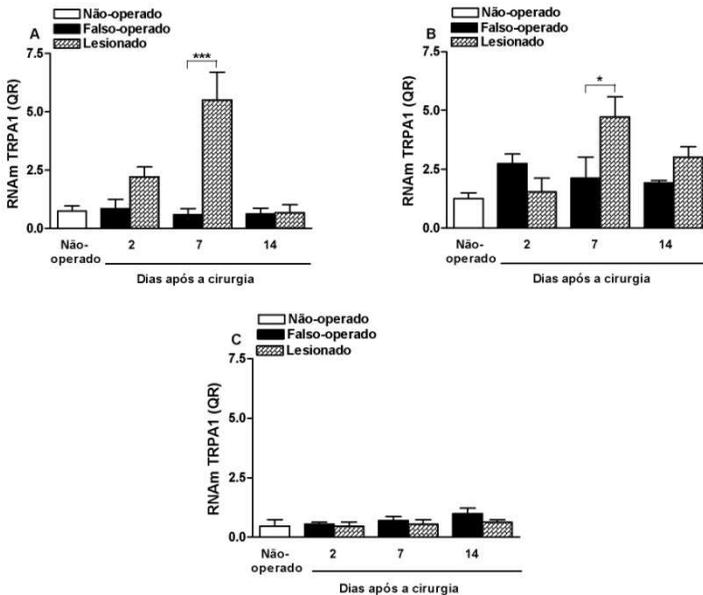


Figura 6. Determinação dos níveis de RNAm para o receptor TRPA1 após a lesão medular. A reação de PCR em tempo real foi realizada em amostras de bexiga urinária (painel A), neurônios do GRD (segmentos medulares L6-S1) (painel B) e porção correspondente da medula espinhal (painel C) de animais não-operados, falso-operados e lesionados coletadas 2, 7 e 14 dias após a cirurgia. Os dados foram normalizados em relação aos níveis de RNAm para a actina contidos na mesma amostra. Os resultados são expressos como quantificação relativa (QR). Cada coluna representa a média e as linhas verticais o e.p.m. de 3 animais. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparado com o respectivo grupo falso-operado (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newmann-Keuls).

4.4 Análise da expressão dos receptores TRPA1 e TRPV1 após a lesão medular

Com o objetivo de confirmar a indução do receptor TRPA1 em decorrência à lesão medular, a sua expressão foi avaliada através da técnica de imuno-histoquímica. Como pode ser observado nas Figuras 7 (A-C) e 8 (A-F), a lesão medular causou aumento significativo na expressão do receptor TRPA1 na bexiga urinária nos dias 7, 14 e 28 (4,3; 2,9 e 3,2 vezes, respectivamente) bem como nos neurônios do GRD nos dias 7 e 14 (48 e 52 vezes, respectivamente) após a cirurgia quando comparado com o respectivo grupo falso-operado. No entanto, não houve alteração significativa na expressão da proteína na medula espinhal.

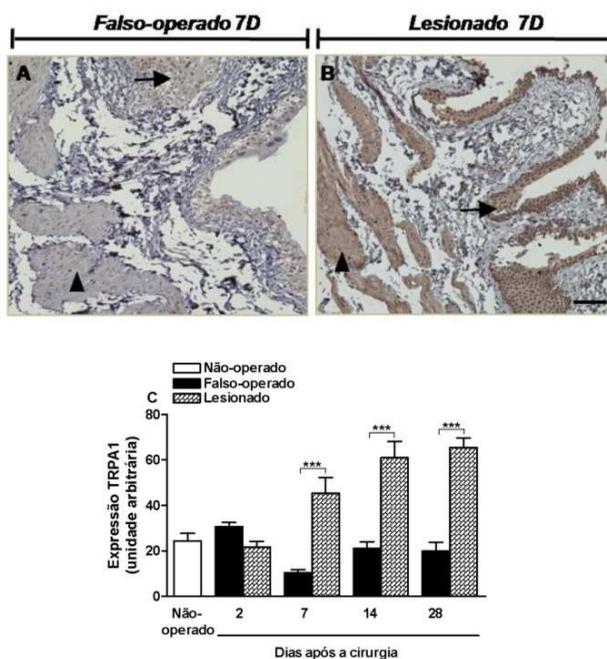


Figura 7. Expressão do receptor TRPA1 na bexiga urinária após a lesão medular. A análise imuno-histoquímica da expressão do receptor TRPA1 foi realizada em bexigas urinárias de animais não-operados, falso-operados e lesionados coletadas 2, 7, 14 e 28 dias após a cirurgia. As imagens representativas de bexiga urinária do grupo falso-operado e lesionado 7 dias após a cirurgia (painéis A e B) mostram intensa imunomarcção para o receptor TRPA1 no urotélio (setas) e no músculo detrusor (cabeça de setas) após a lesão medular (aumento de 20x, escala = 100 μ m). Representação gráfica da intensidade de marcação para o receptor TRPA1 expressa em unidade arbitrária (painel C). Cada coluna representa a média e as linhas verticais o e.p.m. de 3 animais. *** $P < 0,001$ comparado com o respectivo grupo falso-operado (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newmann-Keuls).

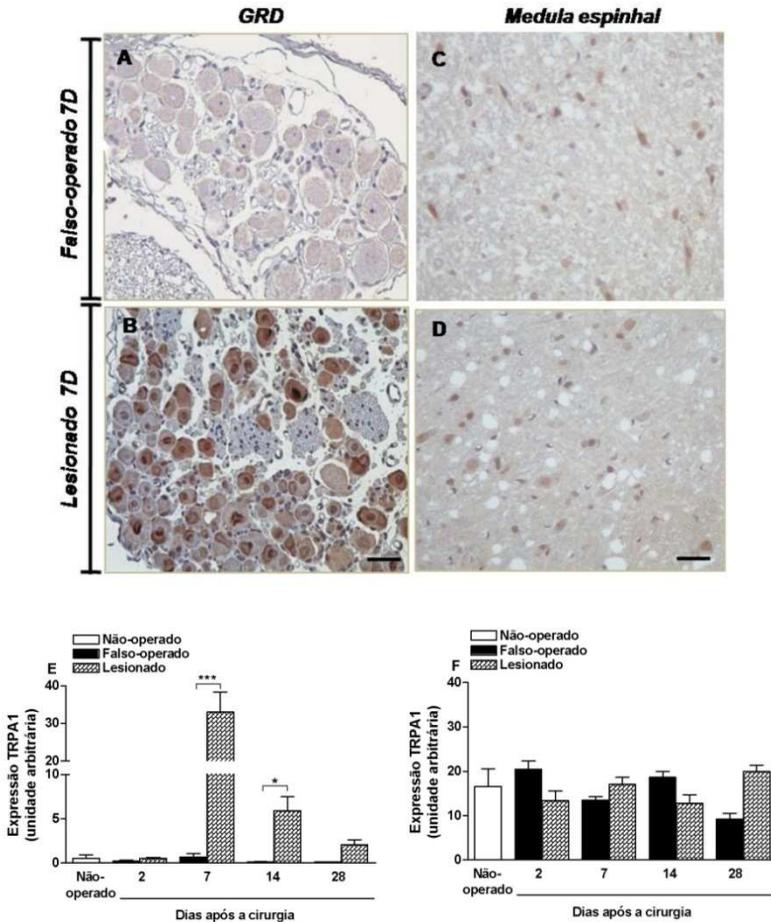


Figura 8. Expressão do receptor TRPA1 nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (segmentos medulares L6-S1) e na porção correspondente da medula espinal após a lesão medular. A análise imuno-histoquímica da expressão do receptor TRPA1 foi realizada em neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) e na medula espinal de animais não-operados, falso-operados e lesionados, coletados 2, 7, 14 e 28 dias após a cirurgia. Imagens representativas dos neurônios do GRD (painéis A e B) e da medula espinal (painéis C e D) do grupo falso-operado e lesionado 7 dias após a cirurgia, respectivamente (aumento de 40x, escala = 100 μ m). Representação gráfica da intensidade de marcação para o receptor TRPA1 nos neurônios do GRD (painel E) e na medula espinal (painel F) expressa em unidade arbitrária. Cada coluna representa a média e as linhas verticais o e.p.m. de 3 animais. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparado com o respectivo grupo falso-operado (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newmann-Keuls).

Com base em estudos mostrando a regulação da expressão do receptor TRPV1 na bexiga urinária de animais e humanos com hiperatividade urinária, a expressão deste receptor foi avaliada nas mesmas condições experimentais descritas para a análise da expressão do receptor TRPA1. A lesão da medula espinal induziu aumento na expressão do receptor TRPV1 na bexiga urinária (dia 28: 8,5 vezes) (Figura 9A-C), nos neurônios do GRD (dia 7: 21,5 vezes) e na medula espinal (dias 2 e 7: 1,7 e 2,5 vezes, respectivamente) (Figura 10A-F).

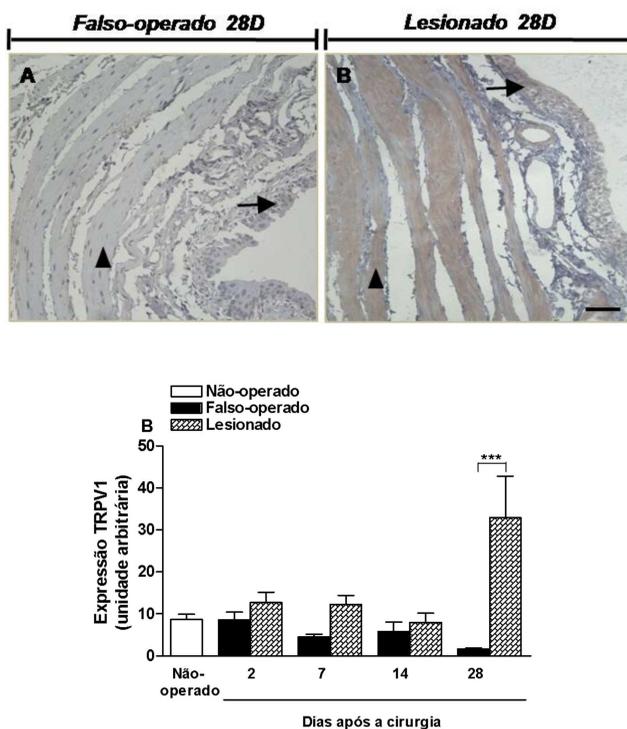


Figura 9. Expressão do receptor TRPV1 na bexiga urinária após a lesão medular. A análise imuno-histoquímica da expressão do receptor TRPV1 foi realizada em bexigas urinárias de animais não-operados, falso-operados e lesionados coletadas 2, 7, 14 e 28 dias após a cirurgia. As imagens representativas de bexiga urinária do falso-operado e grupo lesionado 28 dias após a cirurgia (painéis A e B) mostram intensa imunomarcagem para o receptor TRPV1 no urotélio (setas) e no músculo detrusor (cabeça de setas) após a lesão medular (aumento de 20x, escala = 100 μ m). Representação gráfica da intensidade de marcação para o receptor TRPV1 expressa em unidade arbitrária (painel C). Cada coluna representa a média e as linhas verticais o e.p.m. de 3 animais. *** $P < 0,001$ comparado com o respectivo grupo falso-operado (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newmann-Keuls).

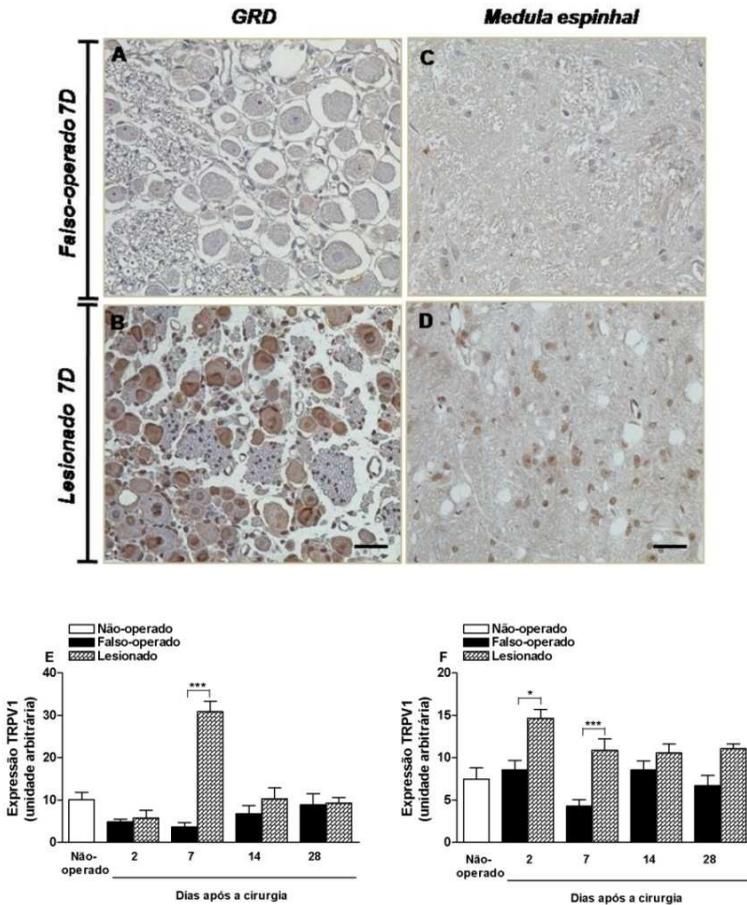


Figura 10. Expressão do receptor TRPV1 nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (segmentos medulares L6-S1) e na porção correspondente da medula espinal após a lesão medular. A análise imuno-histoquímica da expressão do receptor TRPV1 foi realizada em neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) e na medula espinal de animais não-operados, falso-operados e lesionados coletados 2, 7, 14 e 28 dias após a cirurgia. Imagens representativas dos neurônios do GRD (painéis A e B) e da medula espinal (painel C e D) do grupo falso-operado e lesionado 7 dias após a cirurgia (aumento de 40x, escala = 100 μ m). Representação gráfica da intensidade de marcação para o receptor TRPV1 nos neurônios do GRD (painel E) e na medula espinal (painel F) expressa em unidade arbitrária. Cada coluna representa a média e as linhas verticais o e.p.m. de 3 animais. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparado com o respectivo grupo falso-operado (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newmann-Keuls).

4.5 Atividade contrátil da bexiga urinária após a lesão medular

Para avaliar a atividade contrátil da bexiga urinária *in vitro* mediada pela ativação dos receptores TRPA1 e TRPV1 após a lesão medular, as preparações de bexiga urinária foram expostas ao agonista do receptor TRPA1 cinamaldeído (300 μ M) ou ao agonista do receptor TRPV1 capsaicina (0,1 μ M). A Figura 11 (A e B) mostra que ambos, cinamaldeído e capsaicina, induziram resposta contrátil na bexiga urinária de animais não-operados ou falso-operados. Interessantemente, a lesão medular causou aumento da resposta contrátil induzida pelo cinamaldeído (dia 14: $42,8 \pm 14,4\%$ e dia 28: $60,7 \pm 18,0\%$), ou pela capsaicina (dia 14: $98,1 \pm 46,4\%$ e dia 28: $154,8 \pm 34,4\%$).

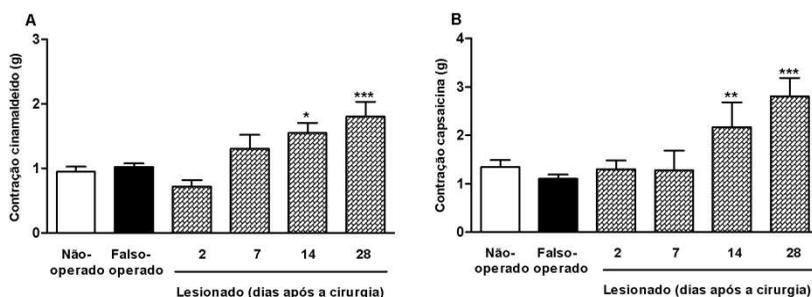


Figura 11. Resposta contrátil da bexiga urinária induzida pela ativação de receptores TRPA1 e TRPV1 após a lesão medular. As preparações de bexiga urinária de animais não-operados, falso-operados e lesionados isoladas 2, 7, 14 e 28 dias após a cirurgia foram expostas ao cinamaldeído (300 μ M, painel A) ou à capsaicina (0,1 μ M, painel B). Os resultados são expressos em g de tensão. Cada coluna representa a média e as linhas verticais indicam o e.p.m de 4-6 experimentos independentes. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ comparado com o grupo falso-operado (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newmann-Keuls).

O mesmo protocolo foi realizado para avaliar a resposta contrátil induzida pela ativação dos receptores muscarínicos ou pela despolarização da membrana celular. A lesão medular potencializou a resposta contrátil induzida pelo agonista muscarínico carbacol (0,1 μ M) (dia 2: $73,0 \pm 12,7\%$; dia 7: $173,1 \pm 22,3\%$; dia 14: $115,6 \pm 19,7\%$; dia 28: $204,7 \pm 38,2\%$) ou pelo agente despolarizante KCl (80 mM) (dia 7: $35,6 \pm 6,4\%$; dia 14: $90,5 \pm 28,1\%$; dia 28: $107,4 \pm 17,2\%$) (Figura 12A e B).

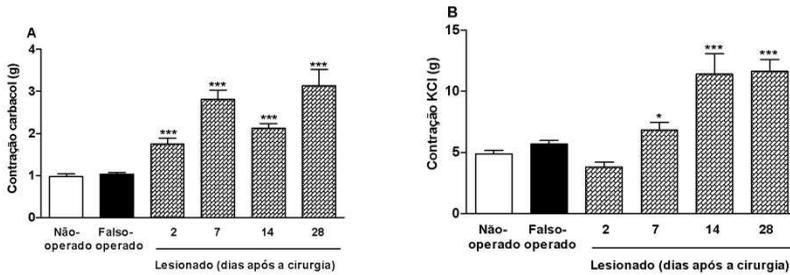


Figura 12. Resposta contrátil da bexiga urinária induzida pela ativação de receptores muscarínicos e pela despolarização celular após a lesão medular. As preparações de bexiga urinária de animais não-operados, falso-operados e lesionados isoladas 2, 7, 14 e 28 dias após a cirurgia foram expostas ao carbacol (0,1 μ M, painel A) ou ao KCl (80 mM, painel B). Os resultados são expressos em g de tensão. Cada coluna representa a média e as linhas verticais indicam o e.p.m de 4-6 experimentos independentes. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparado com o grupo falso-operado (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newmann-Keuls).

A exacerbação das respostas contráteis aos diferentes estímulos após a lesão medular foi evidenciada somente quando os valores das respostas contráteis (em g) não foram divididos pelos valores dos pesos úmidos (em mg) das bexigas urinárias. Caso os resultados fossem expressos em g/mg, as respostas contráteis do grupo lesionado estariam reduzidas em relação ao grupo não-operado e falso-operado, visto que o peso úmido das bexigas urinárias de animais lesionados foi superior as de animais não-operados e falso-operados, não condizendo com os registros típicos. Para comprovar o aumento destas respostas contráteis, as mesmas poderiam ter sido divididas pela área seccional (peso/(comprimento x densidade) da bexiga urinária, expressa em mm^2 , fato este que não foi realizado no decorrer do estudo.

4.6 Participação das células uroteliais na atividade contrátil da bexiga urinária

Para explorar a participação do urotélio na resposta contrátil induzida pelo cinamaldeído (300 μ M) ou pelo carbacol (0,1 μ M), alguns experimentos foram realizados em preparações de bexiga urinária de animais não-operados nas quais as células uroteliais foram removidas. Como observado na Figura 13 (A e B), após a remoção do urotélio as respostas contráteis induzidas pelo cinamaldeído ou pelo carbacol foram reduzidas em $62,0 \pm 2,7\%$ e $72,0 \pm 8,2\%$, respectivamente.

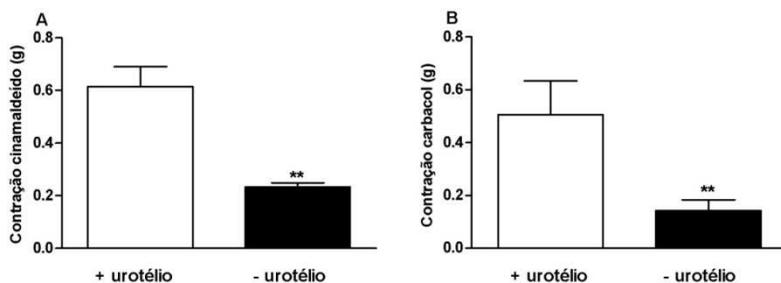


Figura 13. Participação do urotélio na resposta contrátil da bexiga urinária induzida pela ativação de receptores TRPA1 e muscarínicos. As preparações de bexiga urinária (com ou sem urotélio) obtidas de animais não-operados foram expostas ao cinamaldeído (300 µM, painel A) ou ao carbachol (0,1 µM, painel B). Os resultados são expressos em g de tensão. Cada coluna representa a média e as linhas verticais indicam o e.p.m de 4-6 experimentos independentes. ** $P < 0,01$ comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student não pareado).

4.7 Efeito do bloqueio farmacológico *in vitro* sobre a atividade contrátil da bexiga urinária após a lesão medular

A Figura 14A mostra que a exposição prévia das preparações ao antagonista do receptor TRPA1, o HC-030031 (10-100 µM), reduziu de maneira dependente da concentração, a resposta contrátil mediada pelo cinamaldeído (300 µM) em preparações de bexiga de animais falso-operados e lesionados avaliadas 14 dias após a cirurgia. Os valores estimados das CI_{50} para esses efeitos foram 46,3 (23,7 - 68,9) e 31,2 (9,4 - 53,0) µM, respectivamente. O veículo (DMSO 0,1%) correspondente a concentração máxima de HC-030031 (100 µM) não teve efeito a resposta contrátil induzida pelo cinamaldeído (Figura 14B).

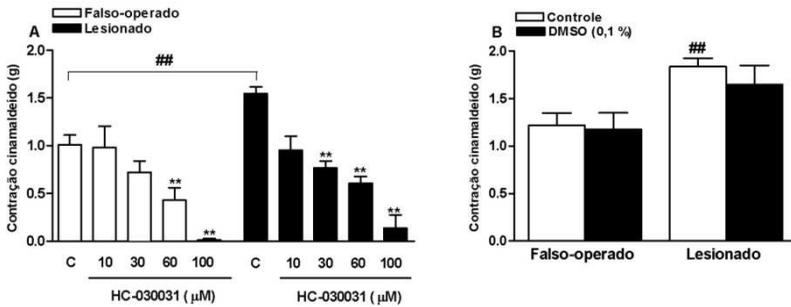


Figura 14. Curva concentração-resposta inibitória para o antagonista do receptor TRPA1, o HC-030031, na resposta contrátil induzida pelo cinamaldeído. As preparações de bexiga urinária de animais falso-operados e lesionados isoladas 14 dias após a cirurgia foram pré-incubadas com HC-030031 (10-100 μM, painel A) ou com veículo (DMSO 0,1%, painel B) e expostas ao cinamaldeído (300 μM). Cada coluna representa a média e as linhas verticais indicam o e.p.m de 4-6 experimentos independentes. ** $P < 0,01$; ## $P < 0,01$ comparado com o grupo falso-operado (controle) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett para A e teste de Student-Newmann-Keuls para B).

Além disso, o antagonista do receptor TRPV1, o SB-366791 (10-300 μM), reduziu de maneira dependente da concentração, a resposta contrátil mediada pelo cinamaldeído (300 μM) em preparações de bexiga de animais falso-operados e lesionados, isoladas no mesmo período pós-cirúrgico (Figura 15A). Os valores estimados das CI_{50} para esses efeitos foram 46,1 (10,8 - 81,4) e 59,9 (1,2 - 118,6) μM, respectivamente. O veículo (etanol 0,3%) correspondente a concentração máxima de SB-366791 (300 μM) não teve efeito a resposta contrátil induzida pelo cinamaldeído (Figura 15B).

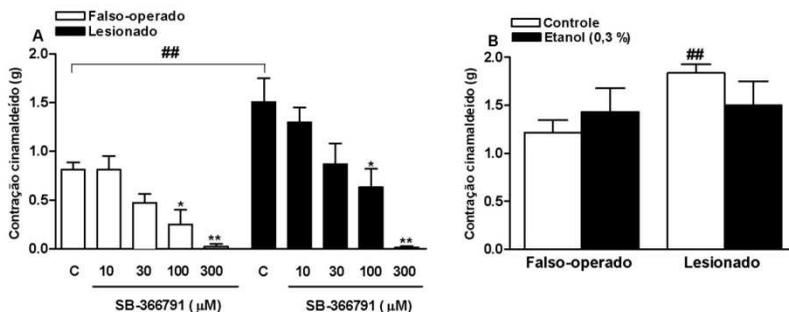


Figura 15. Curva concentração-resposta inibitória para o antagonista do receptor TRPV1, o SB-366791, na resposta contrátil induzida pelo cinamaldeído. As preparações de bexiga urinária de animais falso-operados e lesionados isoladas 14 dias após a cirurgia foram pré-incubadas com SB-366791 (10-300 μM, painel A) ou com veículo (etanol 0,3%, painel B) e expostas ao cinamaldeído (300 μM). Cada coluna representa a média e as linhas verticais indicam o e.p.m de 4-6 experimentos independentes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; ### $P < 0,01$ comparado com o grupo falso-operado (controle) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett para A e teste de Student-Newmann-Keuls para B Student-Newmann-Keuls para B).

4.8 Efeito do bloqueio *in vivo* da síntese do receptor TRPA1 sobre as atividades fásica espontânea e contrátil da bexiga urinária após a lesão medular

Com o objetivo de avaliar se a regulação da síntese do receptor TRPA1 poderia melhorar a contratilidade da bexiga urinária, animais falso-operados e lesionados foram tratados pela via intratecal com AS-ODN TRPA1 por 7 dias consecutivos e as bexigas urinárias coletadas 14 dias após a cirurgia para análise *in vitro*. Comparada à bexiga urinária dos animais falso-operados, a bexiga urinária dos animais lesionados apresentou amplitude maior da atividade fásica espontânea (aproximadamente 3,8 vezes). Interessantemente, o tratamento intratecal com o AS-ODN TRPA1 reduziu em $53,5 \pm 10,4\%$ a amplitude da atividade fásica espontânea da bexiga urinária em animais lesionados, mas não interferiu com este processo em animais falso-operados (Figura 16A). Além disso, o tratamento dos animais falso-operados e lesionados com o AS-ODN TRPA1 foi bastante eficaz em reduzir ($52,4 \pm 7,3\%$ e $53,4 \pm 7,2\%$, respectivamente) a resposta contrátil induzida pelo cinamaldeído (Figura 16B). Por outro lado, a resposta contrátil induzida pelo carbacol não foi alterada pelo tratamento com AS-ODN TRPA1 (Figura 16C).

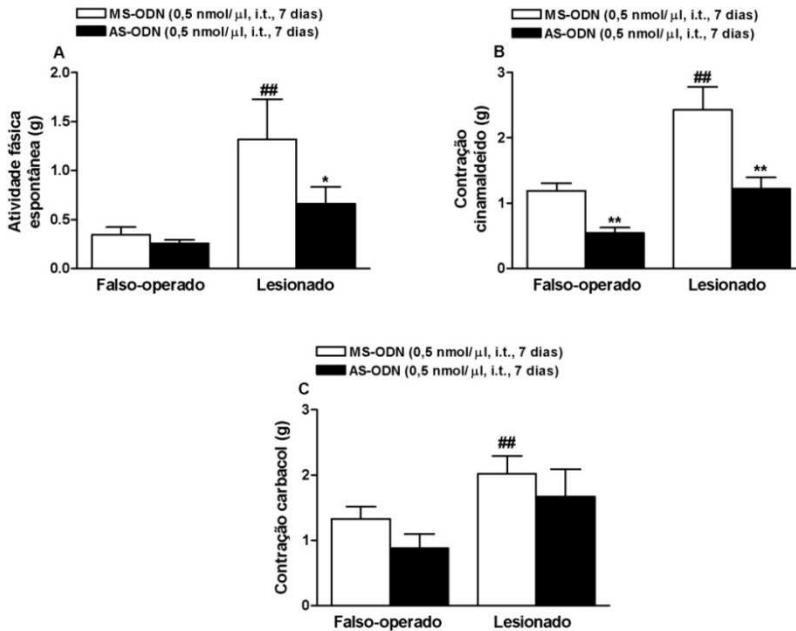


Figura 16. Efeito da inibição da síntese do receptor TRPA1 sobre as atividades física espontânea e contrátil da bexiga urinária após a lesão medular. Animais falso-operados e lesionados foram tratados pela via intratecal com antisense oligodeoxinucleotídeo (AS-ODN: 0,5 nmol/μl) ou com missense oligodeoxinucleotídeo (MS-ODN: 0,5 nmol/μl) para o TRPA1 durante 7 dias e a atividade física espontânea (painel A) e a resposta contrátil das preparações de bexiga urinária induzida pelo cinamaldeído (300 μM, painel B) ou pelo carbacol (0,1 μM, painel C) avaliadas 14 dias após a cirurgia. Os resultados são expressos em g de tensão. Cada coluna representa a média e as linhas verticais indicam o e.p.m de 4-6 experimentos independentes. ## $P < 0,01$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ comparado com o grupo falso-operado ou lesionado tratado com MS-ODN (Teste *t* de Student não pareado).

4.9 Cistometria

A seguir, investigamos os parâmetros urodinâmicos de animais falso-operados e lesionados 28 dias após a cirurgia através da técnica de cistometria. Durante a fase de enchimento da bexiga urinária, os animais lesionados apresentaram maior número de contrações não associadas à micção (CNMs) do que os animais falso-operados ($13,0 \pm 2,3$ e $1,0 \pm 0,3$, respectivamente) (Tabela 1). Além disso, em comparação aos animais falso-operados, os animais lesionados apresentaram alterações

urodinâmicas importantes, tais como: redução do intervalo entre as contrações (IC) ($78,8 \pm 1,6\%$), volume eliminado (VE) ($84,9 \pm 2,2\%$), eficiência de esvaziamento vesical (EEV) ($97,1 \pm 0,5\%$) e aumento na pressão basal (PB) ($186,5 \pm 25,7\%$), pressão limiar (PL) ($70,5 \pm 18,2\%$) e capacidade da bexiga urinária (CBU) ($435,0 \pm 50,7\%$). Entretanto, não foi observada diferença significativa na amplitude da pressão de micção (PM) entre os dois grupos experimentais (Tabela 1e Figura 17).

	Falso-operado	Lesionado
Amplitude média das CNMs (mmHg)	25,1±2,9	21,2±1,2
Número de CNMs	1,0±0,3	13,0±2,3**
Pressão basal (mmHg)	5,3±0,7	15,2±1,4**
Pressão limiar (mmHg)	8,9±0,8	15,1±1,6*
Pressão de micção (mmHg)	33,5±5,6	28,1±1,9
Intervalo entre as contrações (min)	3,5±0,9	0,7±0,05***
Volume eliminado (ml)	0,5±0,1	0,07±0,01**
Capacidade da bexiga urinária (ml)	0,6±0,2	3,4±0,3***
Eficiência de esvaziamento (%)	77,7±5,2	2,2±0,4***

Tabela 1. Alterações dos parâmetros urodinâmicos induzidos pela lesão medular. Cistometria realizada em animais falso-operados e lesionados 28 dias após a cirurgia. Os resultados são expressos como a média e o e.p.m. de 6 animais. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ comparado com o grupo falso-operado (Teste *t* de Student não pareado).

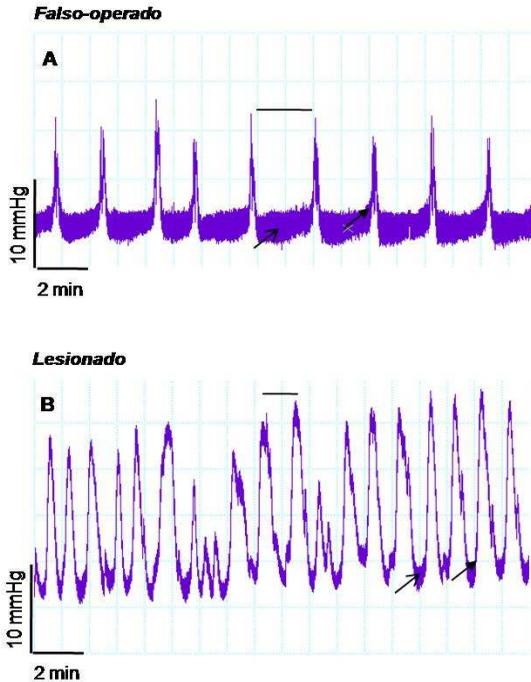


Figura 17. Registros cistométricos representativos. Cistometria realizada em animal falso-operado (painel A) e lesionado (painel B) 28 dias após a cirurgia mostrando alterações nos parâmetros urodinâmicos como pressão basal (PB; seta aberta), pressão limiar (PL; seta fechada) e intervalo entre as contrações (IC; traço).

A partir dos dados obtidos na cistometria, os quais permitiram uma melhor caracterização do modelo de hiperatividade urinária, avaliamos o efeito do tratamento sistêmico agudo dos animais lesionados com o antagonista do receptor TRPA1, o HC-030031 (30 mg/kg, i.v.). A administração do HC-030031 ou do veículo não alterou os parâmetros urodinâmicos de PB, PL, PM, VE, CBU, EEV e IC (Tabela 2). Todavia, o tratamento com HC-030031 causou redução significativa na amplitude ($42,1 \pm 15,0\%$) e no número ($67,0 \pm 8,5\%$) de CNMs, respectivamente (Tabela 2 e Figura 18).

	Lesionado		Lesionado	
	Veículo		HC-030031	
	Pré-tratamento	Pós-tratamento	Pré-tratamento	Pós-tratamento
Amplitude média das CNMs (mmHg)	20,2 ± 0,7	20,7 ± 1,3	21,5 ± 2,1	12,4 ± 3,2 [*]
Número de CNMs	10,6 ± 1,6	8,6 ± 1,7	16,7 ± 3,5	6,6 ± 1,8 [*]
Pressão basal (mmHg)	18,1 ± 1,9	15,5 ± 3,1	25,4 ± 2,4	23,8 ± 1,7
Pressão limiar (mmHg)	16,9 ± 2,5	14,8 ± 2,7	20,3 ± 4,1	17,2 ± 3,2
Pressão de micção (mmHg)	28,5 ± 1,4	27,7 ± 0,8	28,8 ± 3,4	24,9 ± 1,7
Intervalo entre as contrações (min)	0,7 ± 0,03	0,7 ± 0,07	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,3
Volume eliminado (ml)	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Capacidade da bexiga urinária (ml)	2,7 ± 0,3	2,8 ± 0,4	4,0 ± 0,3	3,9 ± 0,6
Eficiência de esvaziamento (%)	3,1 ± 0,1	3,1 ± 0,4	1,2 ± 0,1	2,7 ± 1,4

Tabela 2. Efeito do tratamento sistêmico com HC-030031 sobre os parâmetros urodinâmicos. Animais lesionados foram tratados pela via intravenosa com HC-030031 (30 mg/kg) ou com veículo (DMSO 8% + Tween 80 2% em salina) 28 dias após a cirurgia. Os resultados são expressos como a média e o e.p.m. de 6 animais. ^{*}P<0,05 comparado com os valores obtidos antes da administração do HC-030031 (Teste *t* de Student pareado).

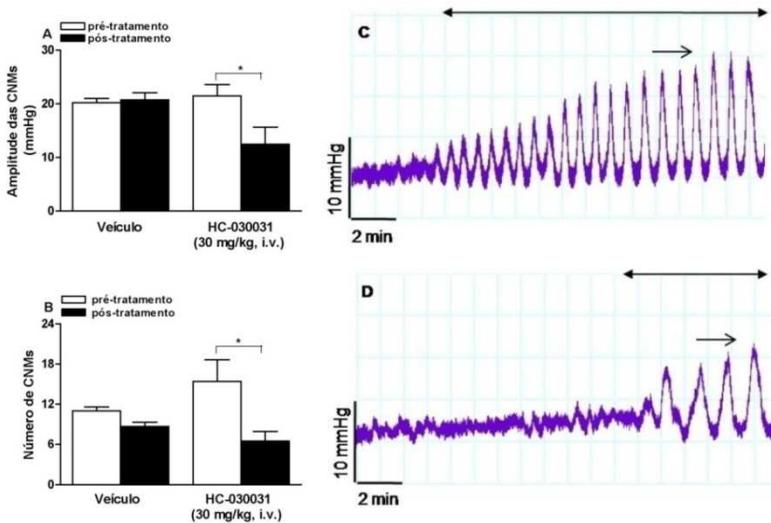


Figura 18. Efeito do tratamento sistêmico com HC-030031 sobre a amplitude e número de contrações não associadas à micção. Animais lesionados foram tratados pela via intravenosa com HC-030031 (30 mg/kg) ou com veículo (DMSO 8% + Tween 80 2% em salina) 28 dias após a cirurgia e avaliadas a amplitude (painel A) e número de contrações não associadas à micção (CNMs) (painel B) da bexiga urinária. Os registros cistométricos representativos de animais lesionados antes (painel C) e após (painel D) a administração de HC-030031 mostram maior amplitude (seta aberta) e número de CNMs (seta fechada) antes da administração do HC-030031. Cada coluna representa a média e as linhas verticais indicam o e.p.m de 6 animais. * $P < 0,05$ comparado com os valores obtidos antes do tratamento com o HC-030031 (Teste *t* de Student pareado).

Ainda como parte da avaliação cistométrica, foi avaliado se o bloqueio da síntese do receptor TRPA1 por um período mais prolongado, através do tratamento intratecal dos animais lesionados com o AS-ODN TRPA1 durante 14 dias consecutivos, poderia ter efeito benéfico sobre as alterações urodinâmicas. Como podemos observar o tratamento com o AS-ODN reduziu significativamente o número ($52,1 \pm 15,6\%$), mas não a amplitude das CNMs (Tabela 3 e Figura 19). Semelhante ao observado para o tratamento com o HC-030031, o tratamento intratecal com AS-ODN não restaurou os parâmetros urodinâmicos de PB, PL, PM, VE, CBU, EEV e IC (Tabela 3).

	Lesionado	Lesionado
	MS-ODN	AS-ODN
Amplitude média das CNMs (mmHg)	20,9±1,1	18,0±4,6
Número de CNMs	13,8±2,1	6,6±2,2*
Pressão basal (mmHg)	11,8±1,5	13,9±2,4
Pressão limiar (mmHg)	15,0±1,9	14,5±2,2
Pressão de micção (mmHg)	27,5±1,3	28,6±2,8
Intervalo entre as contrações (min)	0,9±0,1	1,5±0,8
Volume eliminado (ml)	0,1±0,03	0,2±0,1
Capacidade da bexiga urinária (ml)	3,6±0,3	4,2±0,8
Eficiência de esvaziamento (%)	5,4±2,8	9,7±8,1

Tabela 3. Efeito da inibição da síntese do receptor TRPA1 sobre os parâmetros urodinâmicos. Animais lesionados foram tratados pela via intratecal com antisense oligodeoxinucleotídeo (AS-ODN: 0,5 nmol/ μ l) ou com missense oligodeoxinucleotídeo (MS-ODN: 0,5 nmol/ μ l) para o TRPA1 durante 14 dias e os parâmetros urodinâmicos avaliados 28 dias após a cirurgia. Os resultados são expressos como a média e o e.p.m. de 6 animais. * $P < 0,05$ comparado com o grupo tratado com MS-ODN (Teste t de Student não pareado).

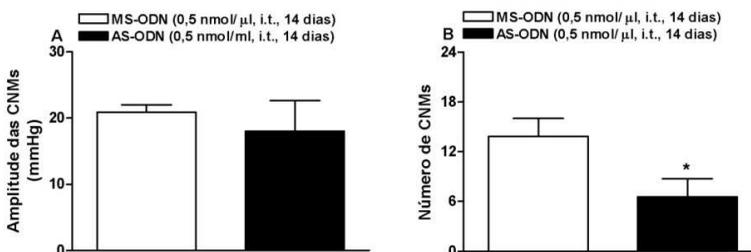


Figura 19. Efeito da inibição da síntese do receptor TRPA1 sobre a amplitude e número de contrações não associadas à micção. Animais lesionados foram tratados pela via intratecal com antisense oligodeoxinucleotídeo (AS-ODN: 0,5 nmol/ μ l) ou com missense oligodeoxinucleotídeo (MS-ODN: 0,5 nmol/ μ l) para o TRPA1 durante 14 dias e a amplitude e número de contrações não associadas à micção (CNMs) avaliadas 28 dias após a cirurgia. Cada coluna representa a média e as linhas verticais indicam o e.p.m. de 6 animais. * $P < 0,05$ comparado com o grupo tratado com MS-ODN (Teste t de Student não pareado).

4.10 Análise da expressão do receptor TRPA1 após o tratamento com antisense oligodeoxinucleotídeo para o TRPA1

Com base nos resultados que mostraram a eficácia do AS-ODN TRPA1 em reduzir o número de CNMs, a amplitude da atividade espontânea da bexiga urinária, bem como a resposta contrátil induzida pelo cinamaldeído, outra etapa de nossos experimentos foi avaliar a expressão do receptor TRPA1 em amostras de bexiga urinária, neurônios do GRD (segmentos medulares L6-S1) e porção correspondente da medula espinhal de animais lesionados tratados com o AS-ODN TRPA1 durante 14 dias. As Figuras 20 (A-D) e 21 (A-F) mostram a redução da expressão do receptor TRPA1 na bexiga urinária ($45,1 \pm 4,3\%$), nos neurônios do GRD ($66,1 \pm 15,0\%$) e na medula espinhal ($67,4 \pm 7,0\%$). Adicionalmente, foi realizada a quantificação relativa da imunoreatividade do receptor TRPA1 para discriminar a intensidade da expressão do mesmo entre o urotélio e o músculo detrusor. Desta forma, foi observada maior expressão do receptor TRPA1 no urotélio ($74,6 \pm 4,2\%$) do que no músculo detrusor. Entretanto, o tratamento com AS-ODN TRPA1 reduziu significativamente a expressão do receptor TRPA1 no músculo detrusor ($57,6 \pm 4,7\%$), mas não nas células uroteliais (Figura 20B e D).

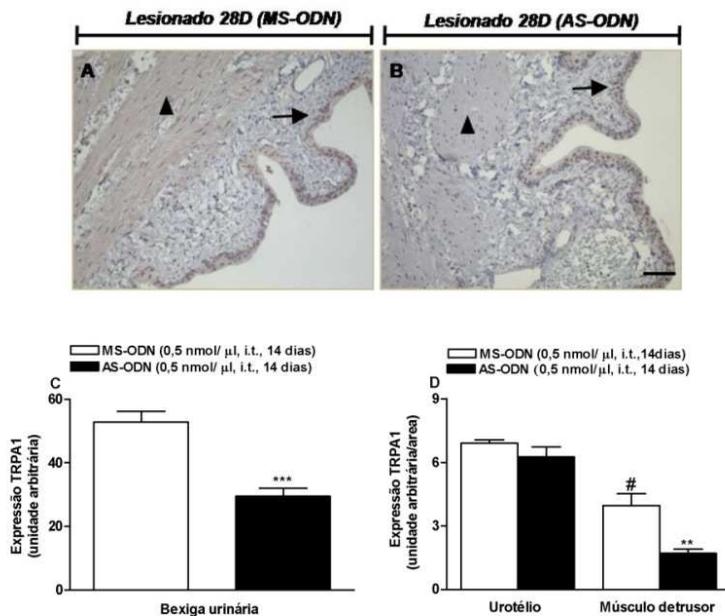


Figura 20. Expressão do receptor TRPA1 na bexiga urinária após o tratamento com antisense oligodeoxinucleotídeo para o TRPA1. A análise imuno-histoquímica da expressão do receptor TRPA1 foi realizada em bexigas urinárias de animais lesionados tratados durante 14 dias pela via intratecal com antisense oligodeoxinucleotídeo (AS-ODN: 0,5 nmol/µl) ou com missense oligodeoxinucleotídeo (MS-ODN: 0,5 nmol/µl) para o TRPA1 e coletadas 28 dias após a cirurgia. As imagens representativas de bexiga urinária mostram a imunomarcção para TRPA1 no urotélio (setas) e no músculo detrusor (cabeças de setas) (aumento de 20x, 100 µm) (painéis A e B). Representação gráfica da intensidade de marcação para o receptor TRPA1 na bexiga urinária (painel C) e no urotélio e músculo detrusor (painel D) expressa em unidade arbitrária. Cada coluna representa a média e as linhas verticais o e.p.m. de 4-6 animais. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado com o grupo tratado com MS-ODN e # $P < 0,01$ comparado com a expressão do TRPA1 no urotélio do grupo tratado com MS-ODN (teste t de Student não pareado para C e ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newmann-Keuls para D).

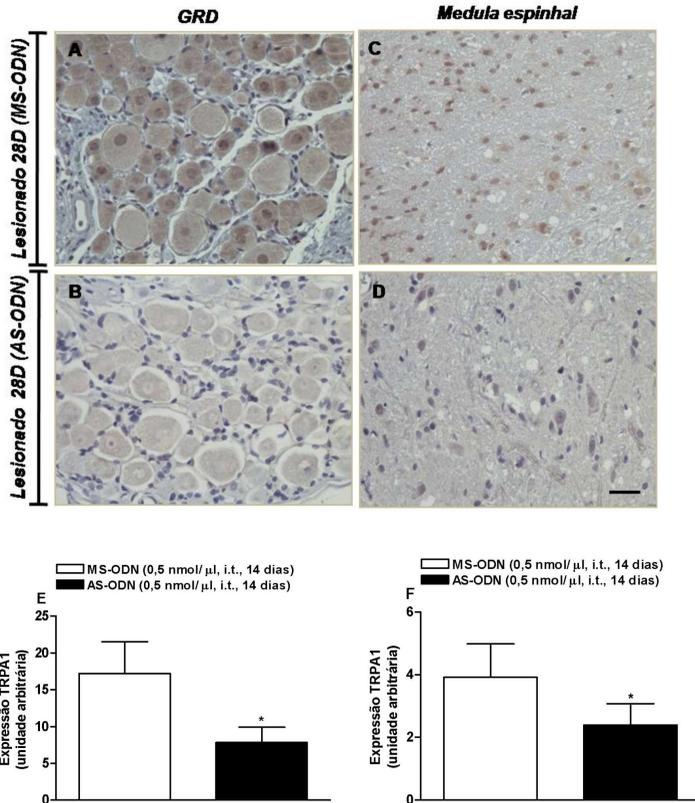


Figura 21. Expressão do receptor TRPA1 nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (segmentos medulares L6-S1) e na porção correspondente da medula espinal após o tratamento com antisense oligodeoxinucleotídeo para o TRPA1. A análise imunohistoquímica da expressão do receptor TRPA1 foi realizada em neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) e na medula espinal de animais lesionados tratados pela via intratecal com antisense oligodeoxinucleotídeo (AS-ODN: 0,5 nmol/μl) ou com missense oligodeoxinucleotídeo (MS-ODN: 0,5 nmol/μl) para o TRPA1 durante 14 dias e coletados 28 dias após a cirurgia. Imagens representativas dos neurônios do GRD (painéis A e B) e da medula espinal (painéis C e D) (aumento de 40x, escala = 100 μm). Representação gráfica da intensidade de marcação para o receptor TRPA1 nos neurônios do GRD (painel E) e na medula espinal expressa em unidade arbitrária (painel F). Cada coluna representa a média e as linhas verticais o e.p.m. de 4-6 animais. * $P < 0,05$ comparado com o grupo tratado com MS-ODN (teste t de Student não pareado).

4.11 Influência da lesão medular sobre a responsividade e a funcionalidade dos receptores TRPA1 e TRPV1 de neurônios do gânglio da raiz dorsal

Para avaliar a influência da lesão medular sobre a responsividade e a funcionalidade dos receptores TRPA1 e TRPV1, neurônios de pequeno diâmetro do gânglio da raiz dorsal (GRD) (segmentos medulares L6-S1) obtidos de animais não-operados, falso-operados e lesionados, 14 dias após o procedimento cirúrgico, foram cultivados e analisados quanto à mobilização de cálcio em resposta ao estímulo com cinamaldeído (300 μ M, agonista TRPA1) ou capsaicina (1 μ M, agonista TRPV1).

Como pode ser observado na Tabela 4, a lesão medular aumentou a proporção de neurônios responsivos ao cinamaldeído (87%, 65/75 células responsivas/total de células analisadas) quando comparado ao grupo não-operado (68%, 30/44). Além disso, não foi observada alteração significativa na proporção de neurônios responsivos ao cinamaldeído entre os grupos não-operado (68%, 30/44) e falso-operado (82%, 33/40). Em relação ao estímulo com a capsaicina (1 μ M), a lesão medular não alterou a proporção de neurônios responsivos a este agonista (88/95, 84%) em comparação ao grupo não-operado (46/55, 84%). Além disso, o grupo falso-operado não apresentou alteração significativa na proporção de neurônios responsivos ao cinamaldeído (42/51, 82%) quando comparado ao grupo não-operado (46/55, 84%) (Tabela 4).

Estímulo	Grupo	Proporção	%
Cinamaldeído	Não-operado	30/44	68
	Falso-operado	33/40	82
	Lesionado	65/75*	87
Capsaicina	Não-operado	46/55	84
	Falso-operado	42/51	82
	Lesionado	88/95	84

Tabela 4. Efeito da lesão medular sobre a responsividade dos neurônios do gânglio da raiz dorsal. Neurônios do GRD de pequeno diâmetro (segmentos medulares L6-S1) de animais não-operados, falso-operados e lesionados cultivados 14 dias após a cirurgia foram estimulados com cinamaldeído (300 μ M) ou com capsaicina (1 μ M) e avaliada a proporção neurônios responsivos. * $P < 0,05$, comparado com o grupo não operado (Teste do qui-quadrado).

Além da proporção de células neuronais responsivas, outro parâmetro analisado foi o influxo de cálcio, o qual indica a funcionalidade dos receptores TRPA1 e TRPV1. A Figura 22A mostra que os neurônios de animais lesionados estimulados com cinamaldeído apresentaram maior mobilização de cálcio intracelular ($72,7 \pm 21,9\%$) em comparação aos neurônios de animais falso-operados. De modo similar, o estímulo com capsaicina induziu maior influxo de cálcio nos neurônios de animais lesionados ($80,2 \pm 21,7\%$), quando comparado aos neurônios de animais falso-operados (Figura 22B). Contudo, não houve alteração na mobilização de cálcio intracelular entre os grupos falso-operado e não-operado em ambos os estímulos. A Figura 22 (C e D) mostra o decurso temporal da mobilização de cálcio intracelular induzido pelo cinamaldeído ou pela capsaicina em neurônios do GRD de animais falso-operados e lesionados.

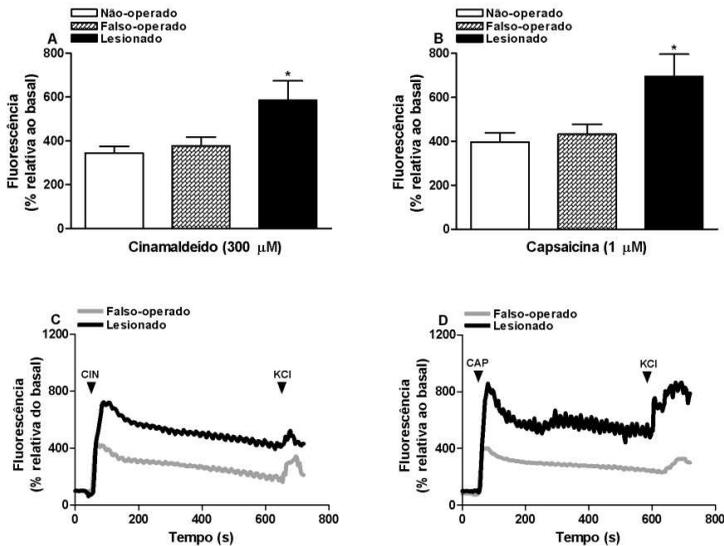


Figura 22. Efeito da lesão medular sobre a funcionalidade dos neurônios do gânglio da raiz dorsal. Aumento de cálcio intracelular induzido pelo cinamaldeído (300 µM, painel A) ou pela capsaicina (1 µM, painel B) em cultura de neurônios do GRD (segmentos medulares L6-S1) de animais não-operados, falso-operados e lesionados realizada 14 dias após a cirurgia. Traçado típico do aumento de cálcio intracelular induzido pelo cinamaldeído (CIN) ou pela capsaicina (CAP) (painéis C e D, respectivamente). O efeito do KCl (30 mM) também foi avaliado. As mudanças na fluorescência (F) foram normalizadas pela fluorescência inicial (F_0) para cada região de interesse e foram expressas como $(F/F_0) \times 100$ (% do basal). Cada coluna representa a média e as linhas verticais indicam o e.p.m de 5 experimentos com um total de 30-80 células. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newmann-Keuls).

4.12 Influência dos fatores neurotróficos sobre a responsividade e funcionalidade dos receptores TRPA1 e TRPV1 de neurônios do gânglio da raiz dorsal

Com o objetivo de avaliar a influência de fatores neurotróficos sobre a responsividade e a funcionalidade dos receptores TRPA1 e TRPV1, os neurônios de pequeno diâmetro do gânglio da raiz dorsal (GRD) (segmentos medulares L6-S1), obtidos de animais não-operados, foram cultivados na ausência ou na presença de concentração elevada (100 ng/ml) de NGF ou BDNF, seguido da análise da mobilização de cálcio em resposta ao estímulo com cinamaldeído (300 μ M) ou capsaicina (1 μ M).

Quando cultivados na ausência de NGF ou BDNF (grupo controle) 68% (30/44) dos neurônios foram sensíveis ao cinamaldeído. Embora não estatisticamente significativo, a presença do NGF aumentou a proporção de neurônios responsivos ao cinamaldeído (82%; 61/74) em comparação ao grupo controle (68%, 30/44). Além disso, o BDNF aumentou significativamente a proporção de neurônios responsivos (89%, 80/90) ao cinamaldeído quando comparado ao grupo controle (68%, 30/44) (Tabela 5).

A mesma análise foi feita em relação ao estímulo com capsaicina. Quando cultivados na ausência de fatores de crescimento (grupo controle) 84% (46/55) das células neuronais foram sensíveis à capsaicina. Entretanto, a proporção de neurônios responsivos à capsaicina não foi alterada significativamente pela presença de NGF (78%, 49/63) ou de BDNF (88%, 65/74) (Tabela 5).

Estímulo	Grupo	Controle		NGF		BDNF	
		Proporção	%	Proporção	%	Proporção	%
Cinamaldeído	Não-operado	30/44	68	61/74	82	80/90**	89
Capsaicina	Não-operado	46/55	84	49/63	78	65/74	88

Tabela 5. Efeito dos fatores neurotróficos sobre a responsividade dos neurônios do gânglio da raiz dorsal. Neurônios do GRD de pequeno diâmetro (segmentos medulares L6-S1) de animais não-operados, previamente expostos a concentrações elevadas de NGF ou BDNF (ambos 100 ng/ml), foram estimulados com cinamaldeído (300 μ M) ou com capsaicina (1 μ M) e avaliada a proporção de neurônios responsivos. ** $P < 0,01$ comparado com o grupo controle (Teste do qui-quadrado).

A seguir, a análise da funcionalidade dos receptores TRPA1 e TRPV1 mostra que, comparativamente ao grupo controle, a incubação dos neurônios com NGF ou BDNF aumentou o influxo de cálcio em resposta ao cinamaldeído (NGF: $93,3 \pm 25,3\%$; BDNF: $97,8 \pm 17,9\%$) (Figura 23A). De modo similar, a incubação dos neurônios do GRD com NGF ou BDNF aumentou o influxo de cálcio em resposta à capsaicina (NGF: $93,6 \pm 44,5\%$; BDNF: $106,4 \pm 18,6\%$) quando comparado ao grupo controle (Figura 23B).

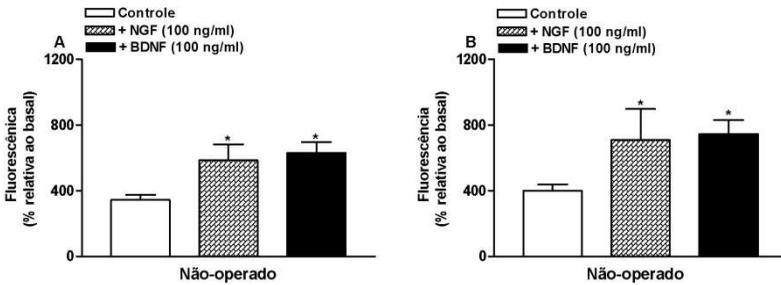


Figura 23. Efeito dos fatores neurotróficos sobre a funcionalidade dos neurônios do gânglio da raiz dorsal. Aumento de cálcio intracelular induzido pelo cinamaldeído (300 μM, painel A) ou pela capsaicina (1 μM, painel B) em cultura de neurônios do GRD (segmentos medulares L6-S1) de animais não-operados previamente expostos a concentrações elevadas de NGF ou BDNF (ambos 100 ng/ml). As mudanças na fluorescência (F) foram normalizadas pela fluorescência inicial (F_0) para cada região de interesse e foram expressas como $(F/F_0) \times 100$ (% relativa ao basal). Cada coluna representa a média e as linhas verticais indicam o e.p.m de 5 experimentos com um total de 30-80 células. * $P < 0,05$, comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newmann-Keuls).

4.13 Níveis de NGF e BDNF após a lesão medular

Tendo em vista os resultados mostrando o aumento da responsividade e da funcionalidade dos receptores TRPA1 e TRPV1 na presença de fatores neurotróficos, investigamos se a lesão medular altera os níveis de fatores neurotróficos. Para isso, foi realizada a dosagem de NGF e BDNF em amostras de bexiga urinária, GRDs (segmentos medulares L6-S1) e porção correspondente da medula espinhal. A Figura 24 (A e C) mostra o aumento significativo nos níveis de NGF na bexiga urinária (5 vezes) e na medula espinhal (8 vezes) somente no 2º dia após a lesão medular. Todavia, nos GRDs foi observada

alteração tardia nos níveis de NGF, ou seja, aumento de 2,5 vezes 28 dias após a lesão medular (Figura 24B).

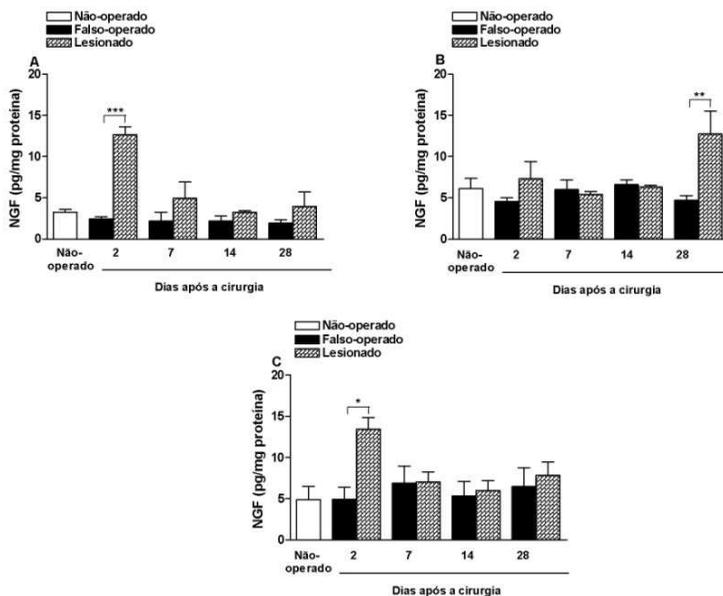


Figura 24. Determinação dos níveis de NGF após a lesão medular. Os níveis do fator de crescimento neuronal (NGF) foram medidos em amostras de bexiga urinária (painel A), GRDs (segmentos L6-S1) (painel B) e porção correspondente da medula espinal (painel C) de animais não-operados, falso-operados e lesionados, coletadas 2, 7, 14 e 28 dias após a cirurgia. Os resultados são expressos em pg/mg de proteína. Cada coluna representa a média e as linhas verticais o e.p.m. de 3 animais. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ comparado com o respectivo grupo falso-operado (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newmann-Keuls).

O aumento nos níveis de NGF foi acompanhado por aumento nos níveis de BDNF na bexiga urinária em todos os períodos analisados (2, 7, 14 e 28 dias: 6, 5, 2 e 5 vezes, respectivamente), nos GRDs (dias 2 e 28: 3 vezes) e na medula espinal (dia 2: 1,7 vezes) após a lesão medular (Figura 25A-C).

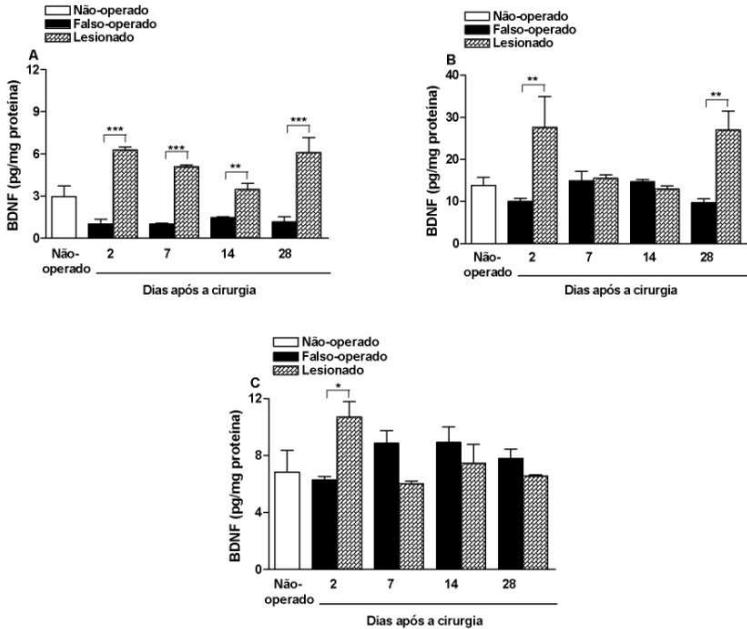


Figura 25. Determinação dos níveis de BDNF após a lesão medular. Os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) foram medidos em amostras de bexiga urinária (painel A), GRDs (segmentos L6-S1) (painel B) e porção correspondente da medula espinal (painel C) de animais não-operados, falso-operados e lesionados, coletadas 2, 7, 14 e 28 dias após a cirurgia. Os resultados são expressos em pg/mg de proteína. Cada coluna representa a média e as linhas verticais o e.p.m. de 3 animais. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado com o respectivo grupo falso-operado (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newmann-Keuls).

5 DISCUSSÃO

A lesão medular causa uma série de danos ao trato urinário inferior. A maioria destes é resultado da interrupção do impulso supraespinal, do impulso aferente para a medula espinal e da reorganização do circuito intraespinal (Vizzard, 1999). Entre as alterações funcionais observadas após a lesão medular estão a perda do controle voluntário da micção, a dissinergia vésico-esfincteriana e a hiperatividade da bexiga urinária. O presente estudo mostrou, através de um modelo experimental de lesão medular em ratos, as principais alterações moleculares e funcionais da bexiga urinária e de forma inédita a participação dos receptores TRPA1 na hiperatividade da bexiga urinária causada pela lesão medular.

No decorrer da padronização do modelo experimental, observamos que o desenvolvimento da hiperatividade urinária era dependente da intensidade da lesão medular. Assim, passamos a utilizar um índice de lesão característico de paraplegia severa, cuja análise quantitativa das conseqüências neurológicas sobre o sistema motor não ultrapassou o escore 3,2 durante as quatro semanas de sobrevida dos animais, escore este similar ao observado previamente por Vanický e colaboradores (2001). Desta forma, após a completa perda da função motora dos membros inferiores nos primeiros períodos posteriores ao procedimento cirúrgico, esta foi melhorada gradativamente, porém com recuperação limitada. Nestes animais, o prejuízo locomotor foi caracterizado pela recuperação parcial da função motora dos membros inferiores, representado por movimento extenso de duas articulações (escore 3), ou movimento discreto das três articulações (escore 4) dos membros inferiores.

A avaliação histológica da bexiga urinária permitiu compreender algumas das alterações fisiopatológicas da bexiga urinária induzidas pela lesão medular. Nos estágios iniciais da lesão medular foram observadas alterações como presença de edema celular, deposição de fibrina e infiltração de polimorfonucleares. Consistente com esses achados foi observada indiretamente, através dos níveis elevados da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), a migração pronunciada de neutrófilos para a bexiga urinária. Adicionalmente, notamos a presença de sangue na urina (hematúria) dos animais lesionados nos primeiros dias após a lesão medular. Portanto, estas alterações podem ser indicativas da presença de cistite hemorrágica, resultante do rompimento dos vasos sanguíneos e do urotélio devido à distensão

excessiva da bexiga urinária, e do processo inflamatório provocado pela infiltração de urina para o tecido subjacente. É importante ressaltar que em pacientes com lesão medular a presença de ulcerações bem como outras anormalidades no urotélio é comum, as quais podem tornar a bexiga urinária vulnerável à cistite crônica, relacionada possivelmente a infecções bacterianas recorrentes (Herrera et al., 2010).

Usando um modelo de lesão medular em ratos, Apodaca e colaboradores (2003) descreveram alterações consideráveis na morfologia e na função de barreira do urotélio nos primeiros períodos após o trauma medular, tais como a presença de áreas de rompimento no urotélio e exposição da lâmina celular subjacente, além da diminuição da resistência transepitelial e aumento da permeabilidade à água e uréia. De acordo com os autores, a morfologia e as funções uroteliais retornaram ao normal dentro de quatro semanas após a lesão medular. Os mecanismos envolvidos nas alterações da função de barreira do urotélio após a lesão medular não estão completamente elucidados, mas alguns fatores como a liberação de catecolaminas de fibras nervosas eferentes e a estimulação por estas de mastócitos, responsáveis pela liberação de histamina, bradicinina, prostaglandina D₂, leucotrieno C₄ e proteases, poderiam contribuir para o dano tecidual e inflamação (Apodaca et al., 2003). Embora não tenhamos avaliado a função do urotélio, nossos resultados mostraram claramente o dano tecidual, caracterizado pela redução intensa e generalizada do número de camadas de células epiteliais nos primeiros períodos após a lesão medular. Nos períodos mais tardios, o dano tecidual foi amenizado e foi observada somente a perda discreta e escassa de células uroteliais.

As alterações histopatológicas da bexiga urinária se estendem também a mudanças na estrutura do músculo detrusor. Embora a sobrecarga mecânica sobre o órgão tenha sido minimizada pelo esvaziamento manual diário da bexiga urinária e pelo desenvolvimento do reflexo de micção involuntário dos animais lesionados ao longo do período, a bexiga urinária pareceu hipertrófica desde o segundo dia após a lesão medular. Este fenômeno foi sugerido através do aumento do peso úmido da bexiga urinária em todos os períodos avaliados. Contudo, não podemos descartar a possibilidade de que este aumento esteja relacionado não somente com a hipertrofia da bexiga urinária, caracterizada pelo alargamento e alongamento dos feixes musculares e pela alteração no conteúdo de colágeno e elastina, mas também devido ao edema tecidual decorrente do processo inflamatório. Portanto, a distensão excessiva da bexiga urinária parece ser um evento crucial para

as alterações histopatológicas na bexiga urinária observadas em nosso estudo.

A lesão medular afeta não somente a estrutura da bexiga urinária, mas também a responsividade desta a estímulos exógenos. Análises *in vitro* mostram o aumento na contratilidade da bexiga urinária à estimulação elétrica, ao agente despolarizante KCl e ao agonista de receptores muscarínicos carbacol (Steers, 2002). Desta forma, nossos resultados permitiram mostrar o aumento, dependente do período da lesão medular, da resposta contrátil da bexiga urinária induzida pelo KCl, pelo carbacol ou ainda pelos agonistas dos receptores TRPA1 e TRPV1, cinamaldeído e capsaicina, respectivamente. O aumento na contratilidade da bexiga urinária após a lesão medular poderia ser explicado, em parte, pela indução da síntese protéica em terminações de fibras aferentes e células uroteliais da bexiga urinária. De fato, tem sido descrito o aumento da expressão de vários canais iônicos e receptores na bexiga urinária, tanto em humanos e como em ratos com hiperatividade urinária, dentre estes receptores purinérgicos (Kim et al., 2008; Pannek et al., 2009), receptores muscarínicos (Stevens et al., 2006; Hinata et al., 2004, Kim et al., 2008), receptores TRPA1 (Du et al., 2008) e TRPV1 (Brady et al., 2004; Apostolidis et al., 2005), além de canais de sódio sensíveis a tetrodotoxina (TTX) (Black et al., 2003).

A maioria dos neurônios aferentes da bexiga urinária exibe potenciais de ação de alto limiar mediado por canais de sódio resistentes à TTX. Entretanto, após a lesão medular a maioria dos neurônios aferentes da bexiga urinária passa a exibir potenciais de ação de baixo limiar mediado por canais de sódio sensíveis à TTX de baixo limiar de ativação, devido ao aumento da expressão destes canais. Desta forma, o potencial de ação neuronal é alterado favorecendo o aumento da excitabilidade dos neurônios aferentes da bexiga urinária (Yoshimura and de Groat, 1997b). Portanto, o aumento da expressão de canais de sódio sensíveis a TTX poderia ser, em parte, responsável pela facilitação da despolarização da membrana celular e consequentemente aumento da resposta contrátil induzida pelo KCl.

Ao compararmos os resultados obtidos através da análise imuno-histoquímica e da análise *in vitro* da contratilidade da bexiga urinária, parece haver correlação entre o aumento da expressão do receptor TRPA1 e da resposta contrátil da bexiga urinária induzida pelo cinamaldeído. Por outro lado, não há uma combinação temporal entre estes fenômenos em relação ao receptor TRPV1. A resposta contrátil induzida pela capsaicina foi potencializada pela lesão medular nos

períodos de 14 e 28 dias, porém a expressão do receptor TRPV1 aumentou somente no período de 28 dias após a lesão medular. Esta discrepância poderia ser explicada por um processo de sensibilização do receptor TRPV1, o qual acentuaria a resposta contrátil à capsaicina. Estudos prévios mostram que o receptor TRPV1 pode ser sensibilizado por mediadores produzidos durante o processo inflamatório. A ativação da proteína quinase A (PKA), da proteína quinase C (PKC) e da quinase II dependente de cálcio-calmodulina (CaMKII) por mediadores inflamatórios pode, através da fosforilação do canal iônico, aumentar sua atividade (Cesare et al., 1999; Premkumar e Ahern, 2000; Bhave et al., 2002). Um processo de sensibilização semelhante poderia ocorrer simultaneamente com o receptor TRPA1, que associado ao aumento da sua expressão, contribuiria para a exacerbação da resposta contrátil ao cinamaldeído. Estudos recentes mostraram um processo de sensibilização do receptor TRPA1 em modelos de inflamação neurogênica, através da ativação da PKC e da PKA por mediadores inflamatórios como as proteases e a bradicinina, e consequentemente a fosforilação do canal iônico, aumentando assim sua atividade (Bautista et al., 2006; Dai et al., 2007; Wang et al., 2008). As vias de sinalização intracelulares comuns no processo de sensibilização dos receptores TRPA1 e TRPV1, sugerem que a transmissão de estímulos inflamatórios pode ser mutuamente controlada por estes receptores. Portanto, os mediadores produzidos durante o processo inflamatório da bexiga urinária observado neste estudo, poderiam ser responsáveis por sensibilizar os receptores TRPA1 e TRPV1, contribuindo para o aumento da contratilidade da bexiga urinária *in vitro* e *in vivo*.

Baseado em estudos que sugerem a co-localização dos receptores TRPA1 e TRPV1 em fibras aferentes da bexiga urinária (Streng et al., 2008) e a interação funcional entre estes na transdução sensorial (Andrade et al., 2006; Bautista et al., 2006; Salas et al., 2009, Staruschenko et al., 2010), avaliamos se o bloqueio seletivo do receptor TRPV1 pelo SB-366791 poderia interferir com a resposta contrátil mediada pela ativação do receptor TRPA1. Interessantemente, a contração da bexiga urinária de animais falso-operados e lesionados em resposta ao cinamaldeído foi reduzida, de modo dependente da concentração, pelo bloqueio do receptor TRPV1. Esses dados corroboram com estudo prévio realizado por nosso grupo, no qual a contração da bexiga urinária isolada de rato induzida pelo cinamaldeído foi parcialmente reduzida pelo SB-366791 (Andrade et al., 2006). Esses resultados sugerem que a interação funcional entre os receptores TRPA1

e TRPV1 parece modular o mecanismo contrátil da bexiga urinária em condições fisiológicas e patológicas.

Fatores adicionais à sensibilização dos receptores TRPA1 e TRPV1 podem ser responsáveis pela exacerbação do mecanismo contrátil da bexiga urinária *in vivo* após a lesão medular. A ativação direta do receptor TRPA1 por produtos do estresse oxidativo gerados no sítio inflamatório, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio e os produtos da peroxidação lipídica tais como o 4-hidroxinonenal (4-HNE), a 15d-PGJ₂ e a acroleína, poderiam interferir na função do receptor TRPA1 em fibras aferentes e em células uroteliais da bexiga urinária. Estes compostos são capazes de ativar o receptor TRPA1 e induzir o influxo de cálcio em cultura de neurônios do GRD e do gânglio nodoso, bem como em células transfectadas com o TRPA1 (Bautista et al., 2006; Andersson et al., 2008, Takahashi et al., 2008). Corroborando com estes achados, a administração intravesical em ratos do mediador inflamatório H₂S, é capaz de induzir hiperatividade urinária por aumentar a frequência de micção e reduzir o volume urinário eliminado (Du et al., 2007; Streng et al., 2008). Portanto, o aumento da atividade dos receptores TRPA1 e TRPV1 induzido pelo processo inflamatório da bexiga urinária, em conjunto com a regulação da expressão destes poderiam contribuir para a hiperatividade da bexiga urinária após a lesão medular.

No contexto da avaliação da expressão do receptor TRPA1, é interessante destacar que o RNAm codificador do receptor TRPA1 é expresso constitutivamente na bexiga urinária, nos neurônios do GRD (segmentos medulares L6-S1) e na porção correspondente da medula espinhal, mas sua expressão foi aumentada somente na bexiga urinária e nos neurônios do GRD, no período de 7 dias após a lesão medular. Consistente com estes dados, a análise imuno-histoquímica permitiu evidenciar o aumento da expressão do receptor TRPA1 na bexiga urinária (7 a 28 dias) e nos neurônios do GRD (7 e 14 dias), mas não na medula espinhal. A expressão do receptor TRPA1 nos neurônios do GRD foi máxima em 7 dias após a lesão medular, diminuindo gradativamente após este período, enquanto o aumento na bexiga urinária foi persistente. Esses dados sugerem que a hiperatividade urinária induzida pela lesão medular parece estar associada com a regulação da expressão do receptor TRPA1 especialmente em terminais das fibras aferentes e células uroteliais da bexiga urinária.

Entretanto, os resultados da análise imuno-histoquímica apontaram diferenças entre os perfis de expressão dos receptores TRPA1 e TRPV1 após a lesão medular. Diferentemente da expressão do

receptor TRPA1, o aumento da expressão do receptor TRPV1 na bexiga urinária foi mais tardio, sendo observado somente 28 dias após a lesão medular. Contrastes também foram observados na expressão do receptor TRPV1 na medula espinhal. Enquanto a expressão do receptor TRPA1 não foi alterada neste tecido, a expressão do receptor TRPV1 foi aumentada nos períodos de 2 e 7 dias após a lesão medular. Porém, o perfil de expressão dos receptores nos neurônios do GRD foi relativamente semelhante, ou seja, foi observado aumento da expressão do receptor TRPV1 no período de 7 dias e do receptor TRPA1 nos períodos de 7 e 14 dias após a lesão medular. Portanto, esses resultados sugerem que o receptor TRPA1 sintetizado nos neurônios do GRD parece ser preferencialmente transportado para a bexiga urinária, mas não para a medula espinhal. Já o receptor TRPV1 sintetizado nos neurônios do GRD parece ser transportado para a medula espinhal e mais tardiamente para a bexiga urinária. Portanto, durante o período de 2 a 14 dias após a lesão medular, o receptor TRPV1 parece estar envolvido na modulação central, enquanto o receptor TRPA1 parece mediar a modulação periférica do processo de micção.

A hipótese de uma modulação central para o controle do processo de micção pelo receptor TRPV1 é reforçada através de estudos realizados em camundongos com deleção gênica para este receptor, os quais apresentaram menor expressão do gene de ativação imediata *c-fos* na medula espinhal sacral durante a fase de enchimento da bexiga urinária (Birder et al., 2002). Além disso, a diminuição da atividade do receptor TRPV1 na medula espinhal pela administração intratecal de resiniferatoxina, reduz a hiperatividade do músculo detrusor em animais com lesão medular (Cruz et al., 2008). Apesar de não termos observado alteração na expressão do receptor TRPA1 na medula espinhal, não podemos excluir completamente o envolvimento deste receptor neste processo em estágios mais avançados da lesão medular, visto que períodos posteriores ao dia 28 não foram avaliados. Além disso, a quantificação da imunoreatividade do receptor TRPA1 em todas as regiões da medula espinhal poderia dificultar a detecção de alterações na expressão do receptor neste tecido. Desta forma, estudos complementares utilizando um marcador neuronal para identificar as áreas específicas da medula espinhal, às quais recebem projeções de fibras aferentes da bexiga urinária, tais como a comissura dorsal, o corno dorsal superficial e o núcleo parassimpático sacral (Fowler et al., 2008) e a avaliação posterior da expressão dos receptores TRPA1 e TRPV1 nestas áreas devem ser avaliadas para esclarecer esta questão.

A bexiga urinária apresenta atividade espontânea durante a fase de enchimento do órgão ou quando as preparações de bexiga urinária são submetidas à tensão (Steers e Tuttle, 2006). A atividade fásica espontânea da bexiga urinária *in vitro* parece estar relacionada à atividade não miccional (contrações não associadas à micção) durante a fase de enchimento da bexiga urinária observada em muitas espécies, incluindo humanos. As contrações fásicas da bexiga urinária são causadas pelo potencial de ação gerado dentro do músculo detrusor. Estas são pequenas se comparadas àquelas provocadas por estímulo exógeno ou pelo reflexo de micção. O papel dessas contrações é permitir que as células musculares ajustem o seu comprimento em resposta ao enchimento da bexiga urinária. Áreas limitadas do músculo detrusor normal contraem com a distensão da bexiga urinária, sugerindo assim um acoplamento discreto entre as células musculares. Porém, preparações de bexiga urinária de pacientes com hiperatividade urinária apresentam contrações tetânicas, características de um acoplamento acentuado entre as células musculares. Neste contexto, o aumento da amplitude, mas não da frequência da atividade espontânea da bexiga urinária é observada em humanos e em animais com hiperatividade urinária (Brading, 1997; Ikeda e Kanai, 2008). Reforçando estes achados, observamos também aumento na amplitude da atividade fásica espontânea da bexiga urinária de animais lesionados, reproduzindo assim este parâmetro fisiopatológico característico da hiperatividade da bexiga urinária.

Atualmente existe um grande interesse no entendimento dos mecanismos envolvidos na modulação da atividade fásica espontânea da bexiga urinária, visto que a redução desta poderia ser eficaz no tratamento dos sintomas associados à hiperatividade urinária. A participação do receptor TRPA1 neste processo foi evidenciada através dos resultados mostrando que a amplitude da atividade fásica espontânea das preparações de bexiga urinária de animais lesionados, mas não de animais falso-operados, foi significativamente reduzida pelo tratamento intratecal com o AS-ODN TRPA1. A partir desse resultado, podemos supor que a redução da expressão do receptor TRPA1 na bexiga urinária resultaria em liberação diminuída de neurotransmissores em decorrência da sua ativação, como a acetilcolina, e de mediadores locais como as prostaglandinas e endotelinas, responsáveis pela modulação da atividade fásica espontânea da bexiga urinária. Em função da origem miogênica da atividade espontânea da bexiga urinária, poderíamos ainda sugerir que o receptor TRPA1 estaria expresso nas próprias células intersticiais da bexiga urinária, também denominadas de

miofibroblastos, colaborando diretamente para a alteração da atividade fásica espontânea. Entretanto, sua expressão ainda não foi descrita em células intersticiais da bexiga urinária de humanos e de ratos, somente em células intersticiais da uretra de humanos (Gratzke et al., 2009). Portanto, o receptor TRPA1 parece desempenhar papel importante na modulação da atividade fásica espontânea em estados patológicos da bexiga urinária.

Adicionalmente, os estudos *in vitro* reportados no presente estudo mostraram que a resposta contrátil induzida pelo cinamaldeído na bexiga urinária de animais falso-operados e lesionados foi reduzida significativamente pelo tratamento com AS-ODN TRPA1. A redução da expressão do receptor TRPA1 nos neurônios do GRD e na medula espinhal confirmou a eficácia do tratamento com AS-ODN, o qual parece atingir os corpos celulares dos neurônios do GRD lombares e sacrais e reduzir a expressão protéica nos terminais aferentes neuronais da bexiga urinária, o que explicaria a inibição da contração da bexiga urinária *in vitro* mediada pela ativação do receptor TRPA1. Interessantemente, o AS-ODN TRPA1 não alterou a resposta contrátil induzida pelo carbacol, o que confirma a seletividade do mesmo sobre a síntese do receptor TRPA1 e indica que a resposta contrátil mediada pela ativação de receptores muscarínicos não envolve a participação do receptor TRPA1. Entretanto, a resposta contrátil induzida pelo cinamaldeído não foi completamente abolida pelo tratamento com AS-ODN nos dois grupos experimentais. Isto pode ser explicado através dos dados mostrando que o AS-ODN reduziu a expressão do receptor TRPA1 no músculo detrusor, ou melhor, nas fibras aferentes innervando os feixes musculares, mas não no urotélio. Portanto, o urotélio seria um componente importante para o processo contrátil mediado pelo receptor TRPA1 na bexiga urinária. Além disso, os resultados mostrando que o tratamento intratecal com AS-ODN, ou ainda, que a exposição das preparações de bexiga urinária ao HC-030031, reduziu a resposta contrátil induzida pelo cinamaldeído na bexiga urinária de animais falso-operados e lesionados reforçam a hipótese da participação do receptor TRPA1 no processo contrátil normal e exacerbado da bexiga urinária.

A relevância do urotélio na resposta contrátil mediada pela ativação do receptor TRPA1 foi novamente evidenciada através dos dados mostrando que, a remoção das células uroteliais reduz em aproximadamente 60% a resposta contrátil mediada pelo cinamaldeído na bexiga urinária de animais não-operados. É importante notar que, nos primeiros estágios da lesão medular, nos quais há uma grande perda de

células uroteliais, a resposta contrátil induzida pelo cinamaldeído não é aumentada. Desta forma, poderíamos sugerir que o aumento da resposta contrátil da bexiga urinária mediada pelo cinamaldeído, depende em grande parte, da expressão do receptor TRPA1 em células uroteliais. Os resultados mostrando a imunoreatividade para o receptor TRPA1 mais intensa no urotélio do que no músculo detrusor no período de 28 dias após a lesão medular, período no qual o dano no urotélio é discreto, reforçam a hipótese de que o aumento da expressão do receptor TRPA1 no urotélio está correlacionado com o aumento da resposta contrátil ao cinamaldeído após a lesão medular. No entanto, desconhecemos o efeito da remoção das células uroteliais sobre a resposta contrátil mediada pelo cinamaldeído na bexiga urinária de animais lesionados. Portanto, estudos adicionais seriam necessários para esclarecer esta questão.

Com o intuito de aprofundar os estudos sobre o envolvimento do receptor TRPA1 na hiperatividade da bexiga urinária, avaliamos os parâmetros urodinâmicos do processo de micção em animais falso-operados e lesionados. Estudos prévios mostraram que, durante os primeiros quatro dias após a lesão medular, a bexiga urinária torna-se arreflexa e, a partir do quinto dia surgem as contrações da bexiga urinária não associadas à micção (CNMs) (Takahara et al., 2007). De fato, a análise cistométrica da bexiga urinária realizada 28 dias após a lesão medular, mostrou o aumento significativo no número de CNMs durante a fase de enchimento do órgão. Consistente com os resultados positivos obtidos com o AS-ODN TRPA1 sobre a atividade fásica espontânea da bexiga urinária, este tratamento reduziu o número de CNMs (52%) enquanto o HC-030031 reduziu a amplitude (42%) e o número das CNMs (67%). A diferença da eficácia dos tratamentos poderia ser explicada, em parte, pela extensão da área atingida, ou seja, a administração sistêmica com HC-030031 atinge o receptor TRPA1 expresso em fibras nervosas e em células uroteliais e a administração intratecal com AS-ODN atinge somente o receptor TRPA1 expresso em fibras nervosas como observado na análise imuno-histoquímica.

Em humanos e em animais, a interrupção das vias descendentes controlando os neurônios motores abaixo do local da lesão na medula espinhal, resulta na perda do controle motor do músculo estriado do esfíncter uretral externo e no desenvolvimento de dissinergia véscio-esfíncteriana (Shefchyk et al., 2006). Através da análise cistométrica, observamos a redução do intervalo entre as contrações da bexiga urinária de animais lesionados, indicando que a bexiga urinária está contraindo exacerbadamente, o que facilitaria a micção e representaria um quadro de incontinência urinária, porém o esvaziamento vesical não

é realizado adequadamente devido à contração simultânea do esfíncter uretral externo (dissinergia vésico-esfincteriana). Este fenômeno é evidenciado através das alterações urodinâmicas representadas pela redução do volume eliminado, aumento no volume residual e a diminuição drástica da eficiência no esvaziamento vesical, provocando consequentemente o aumento da pressão basal e da pressão limiar.

Uma hipótese que explicaria o desenvolvimento da dissinergia vésico-esfincteriana após a lesão medular seria que, o impulso aferente da bexiga urinária para a medula espinhal sacral, conduzido pelas fibras aferentes C, estimularia os neurônios motores responsáveis pelo controle do esfíncter uretral externo através de novos interneurônios, novas conexões sinápticas e/ou mudanças na neurotransmissão dentro do circuito intraespinhal reorganizado após a lesão medular (Karsenty et al., 2005). De fato, Seki e colaboradores (2004) observaram que após a lesão medular, o aumento na expressão de NGF (um dos fatores neurotróficos responsáveis por induzir hiperexcitabilidade das fibras C) na medula espinhal sacral, está relacionado com a atividade do esfíncter uretral externo durante as contrações de micção da bexiga urinária. Corroborando com estes achados, também observamos aumento nos níveis de NGF na medula espinhal após a lesão medular. Deste modo, a modulação da atividade aferente da bexiga urinária seria uma estratégia terapêutica para reduzir a dissinergia vésico-esfincteriana. No entanto, observamos que o tratamento com o HC-030031 ou com o AS-ODN TRPA1 não apresentou efeito sobre o volume eliminado ou sobre o volume residual e, consequentemente sobre a eficiência do esvaziamento vesical, sugerindo que o receptor TRPA1 não está envolvido na modulação da atividade do esfíncter uretral externo.

Estudos prévios mostraram que a distensão excessiva da bexiga urinária provocada pela dissinergia vésico-esfincteriana ou pela ligação parcial da uretra é responsável pela indução de hipertrofia dos neurônios aferentes e do músculo detrusor da bexiga urinária (Steers et al., 1991). Este fenômeno indica que, mudanças na bexiga urinária podem influenciar as propriedades de neurônios aferentes que inervam este órgão. Desta forma, é provável que as mudanças fenotípicas em neurônios aferentes da bexiga urinária, sejam devido à interação das fibras nervosas aferentes com a bexiga urinária, ao invés de uma interação com a medula espinhal lesionada. Esta interação após a lesão medular pode ser mediada pelo aumento na produção de fatores neurotróficos na bexiga urinária, e o transporte retrógrado destes para os corpos celulares neuronais, visto que os níveis do fator de crescimento neuronal (NGF), do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), do

fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), das neurotrofinas 3 e 4 (NT3 e 4) estão aumentados em bexigas hipertrofiadas de ratos com lesão medular ou ligação parcial da uretra (Vizzard, 2000; Zvara et al., 2002). Além disso, a hipertrofia de neurônios aferentes e eferentes que inervam a bexiga urinária é minimizada em parte, pela administração intratecal de anticorpo anti-NGF (Steers et al., 1991, 1996). Reforçando estes achados, foi observado que a administração intratecal ou intravesical de NGF pode sensibilizar as fibras aferentes da bexiga urinária e induzir hiperatividade urinária (Yoshimura et al., 2006; Zvara e Vizzard, 2007). Nossos resultados sugerem que a distensão excessiva da bexiga urinária causada pela dissinergia vésico-esfincteriana está associada com a produção aguda de NGF (2 dias após a lesão medular) e a produção aguda e crônica de BDNF (2 a 28 dias após a lesão medular) pelo órgão.

Vários estudos mostram que o NGF e o BDNF estão envolvidos na regulação da expressão e da sensibilidade dos receptores TRPA1 (Babes et al., 2004; Obata et al., 2005; Diogenes et al., 2007; Anand et al., 2008; Ciobanu et al., 2009) e TRPV1 (Amaya et al., 2004; Zhang et al., 2005; Ciobanu et al., 2009) em neurônios sensoriais. Desta forma, as alterações de expressão dos receptores TRPA1 e TRPV1 na bexiga urinária dos animais lesionados poderiam ser mediadas pelas ações do NGF e do BDNF. Considerando o aumento observado nos níveis de NGF e BDNF na bexiga urinária em estágios iniciais da lesão medular, estes poderiam ser os responsáveis pelo aumento na expressão do receptor TRPA1 na bexiga urinária observado 7 dias após a lesão medular. Por outro lado, o BDNF poderia ser o responsável pelo aumento da expressão do receptor TRPA1 na bexiga urinária nos estágios subseqüentes e do receptor TRPV1 no período de 28 dias após a lesão medular, tendo em vista o aumento duradouro (2-28 dias) nos níveis deste fator neurotrófico neste tecido. Entretanto, não podemos descartar a participação de outras neurotrofinas na transcrição gênica destes receptores, tendo em vista que somente o NGF e o BDNF foram avaliados neste estudo.

Os fatores neurotróficos produzidos na medula espinhal e/ou na bexiga urinária, especificamente nas células uroteliais e no músculo detrusor, ativam um ou mais membros da família de receptores tirosina quinase (TrkA, TrkB e TrkC) e o receptor p75 e são transportados retrogradamente para os corpos celulares de neurônios do GRD (Reichardt, 2006). Por exemplo, o NGF produzido na bexiga urinária ativa receptores TrkA nos terminais nervosos na bexiga urinária ou na medula espinhal, resultando na internalização e transporte retrógrado do

complexo TrkA/NGF ativado para o corpo celular dos neurônios do GRD (Kuruvilla et al., 2004). Em nossos experimentos, observamos aumento de NGF nos neurônios do GRD somente 28 dias após a lesão medular. Entretanto, a disponibilidade maior de NGF nos neurônios do GRD parece não ser oriunda do transporte retrógrado de NGF dos terminais nervosos da bexiga urinária, tendo em vista o grande intervalo de tempo decorrido entre a redução da expressão de NGF na bexiga urinária (7 dias) e o aumento nos neurônios do DRG (28 dias). Portanto, parece mais provável que o aumento do NGF observado nos neurônios do GRD 28 dias após a lesão medular seja proveniente do transporte retrógrado do NGF dos terminais centrais da medula espinhal em direção aos corpos celulares dos neurônios do GRD. Reforçando esta hipótese, observamos que a lesão medular causou aumento na expressão de NGF na medula espinhal com pico em 2 dias, seguido de redução gradativa em 7 dias, retornando ao nível basal em 14 dias e seguido de aumento, embora não significativo, em 28 dias após a lesão medular. Assim, uma proporção do NGF sintetizado na medula espinhal poderia ter sido transportada para os corpos celulares dos neurônios do GRD. Diferente do que foi observado para o NGF, os níveis de BDNF nos neurônios do GRD foram significativamente aumentados nos períodos de 2 e 28 dias após a lesão medular. Portanto, uma proporção do BDNF formado na bexiga urinária e na medula espinhal pode ter sido transportada retrogradamente para os corpos celulares dos neurônios do GRD, considerando o aumento deste fator neurotrófico na bexiga urinária em todos os períodos analisados e na medula espinhal 2 dias após a lesão medular.

A partir dos dados mostrando que a lesão medular induz aumento na expressão dos receptores TRPA1 e TRPV1 nos neurônios do GRD, a próxima etapa deste estudo foi avaliar a responsividade e a funcionalidade desses receptores. Nossos resultados mostram que a lesão medular induziu aumento na proporção de neurônios responsivos e no influxo de cálcio após o estímulo com o agonista do receptor TRPA1 cinamaldeído. Além disso, a lesão medular causou aumento no influxo de cálcio, mas não no número de neurônios responsivos após o estímulo com o agonista do receptor TRPV1 capsaicina. Desta forma, a lesão medular induziu aumento na responsividade e na funcionalidade do receptor TRPA1 e na funcionalidade do receptor TRPV1 expressos nos neurônios do GRD.

Ainda neste sentido, considerando que os fatores neurotróficos podem alterar além da expressão, a sensibilidade dos receptores TRPA1 e TRPV1, avaliamos se o NGF e o BDNF poderiam ser os responsáveis

pelas alterações na funcionalidade e na responsividade dos receptores TRPA1 e TRPV1 expressos nos neurônios do GRD. Observamos que em neurônios do GRD de animais não lesionados, a presença de NGF aumentou o influxo de cálcio após estímulo com cinamaldeído. Por outro lado, a presença de BDNF aumentou o influxo de cálcio e também o número de neurônios responsivos ao cinamaldeído. Em relação ao receptor TRPV1, observamos que a presença de NGF ou de BDNF aumentou o influxo de cálcio, mas não o número de neurônios responsivos à capsaicina. Assim, podemos sugerir que o número de neurônios responsivos à estimulação do receptor TRPV1 não foi alterado devido à expressão inalterada do receptor TRPV1 nos neurônios do GRD 14 dias após a lesão medular, período no qual os neurônios do GRD foram cultivados e analisados. Em conjuntos, estes resultados permitem sugerir que o aumento nas respostas funcionais de receptores TRPA1 e TRPV1 nos neurônios do GRD após a lesão medular pode ser devido ao NGF e/ou ao BDNF, os quais sensibilizam estes receptores, tornando-os mais funcionais.

Apesar da demonstração de que o NGF e o BDNF modulam a funcionalidade e responsividade dos receptores TRPA1 e TRPV1, não observamos aumento na expressão destes fatores neurotróficos nos neurônios do DRG no período de 14 dias após a cirurgia, no qual a cultura neuronal foi realizada. Esta discrepância poderia ser explicada através de duas possibilidades. A primeira seria que o NGF poderia unir e ativar o receptor TrkA nos terminais nervosos, e o receptor TrkA ativado, em um complexo com NGF ou ainda sem o NGF, geraria o sinal retrógrado. Outra possibilidade é que o NGF ative o receptor TrkA em terminais nervosos, e conseqüentemente o receptor TrkA estimule alguns substratos, os quais promoveriam a sinalização retrógrada. Nestas duas hipóteses, o elemento fundamental é o receptor TrkA ativado e não necessariamente o transporte dos fatores neurotróficos com o receptor TrkA ativado (Miller e Kaplan, 2001). Portanto, a sinalização retrógrada pode não desencadear o aumento de fatores neurotróficos nos corpos celulares de neurônios do GRD. Estes resultados mostram que os fatores neurotróficos são elementos importantes para a modulação da atividade dos receptores TRPA1 e TRPV1 nos neurônios do GRD, contribuindo assim para a hiperatividade da bexiga urinária após a lesão medular.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que a lesão medular em ratos é uma ferramenta importante para avaliar as alterações histológicas, moleculares e funcionais observadas na hiperatividade da bexiga urinária decorrente de neuropatologias. A distensão excessiva da bexiga urinária, decorrente da dissinergia vésico-esfincteriana, parece ser um evento crucial para a indução das alterações na bexiga urinária, nos neurônios do GRD e na medula espinhal observadas em nosso estudo. Assim observamos o dano nas células uroteliais, o processo inflamatório, a hipertrofia muscular, a produção de fatores neurotróficos e conseqüentemente a indução da síntese protéica, que em conjunto contribuem para o aumento da excitabilidade de fibras aferentes da bexiga urinária e o desenvolvimento de hiperatividade urinária. O receptor TRPA1 está nitidamente relacionado com o aumento da excitabilidade das fibras aferentes da bexiga urinária após a lesão medular, contribuindo significativamente para o aumento da atividade fásica espontânea da bexiga urinária *in vitro* e o surgimento de contrações não associadas à micção observadas *in vivo*. Os receptores TRPA1 e TRPV1 presentes em terminações periféricas e/ou centrais de neurônios aferentes, nos corpos celulares dos neurônios aferentes no GRD e em células uroteliais da bexiga urinária parecem integrar os mecanismos fisiopatológicos do processo de micção observados após a lesão medular. Assim, o entendimento acerca da participação do receptor TRPA1 na fisiopatologia da hiperatividade urinária pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento desta importante disfunção urológica.

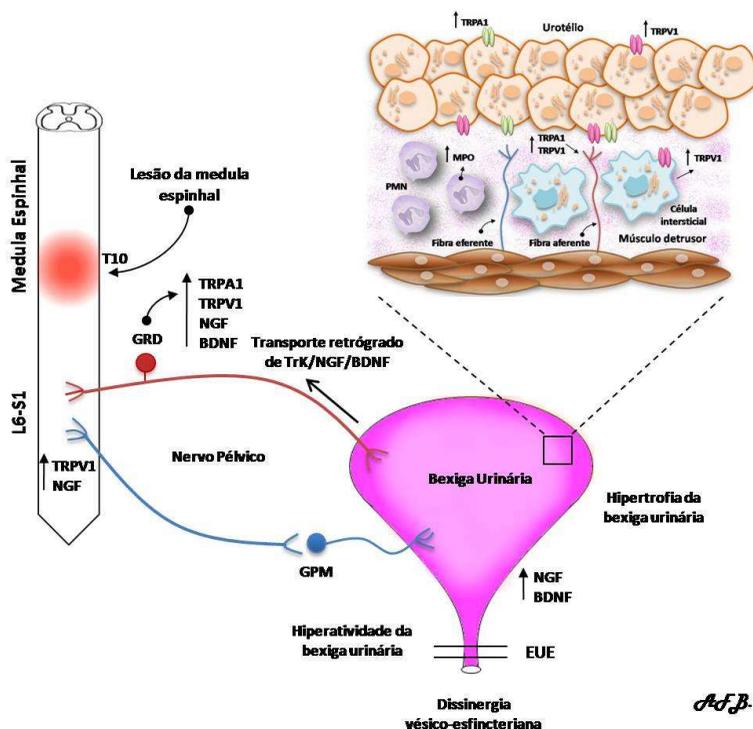


Figura 26. Mecanismos propostos para a participação do receptor TRPA1 na hiperatividade da bexiga urinária decorrente da lesão medular. A lesão medular interrompe o controle motor do esfíncter uretral externo, induzindo dissinergia vésico-esfincteriana. Desta forma, a obstrução funcional do esfíncter uretral causa retenção urinária e prejuízo no esvaziamento vesical. A distensão excessiva da bexiga urinária pelo grande volume residual de urina induz hipertrofia do órgão, resultando em aumento na produção de NGF e BDNF, bem como na expressão dos receptores TRPA1 e TRPV1 em células uroteliais e fibras aferentes que inervam a bexiga urinária. A expressão de NGF e do receptor TRPV1 também está aumentada na medula espinhal, indicando uma possível participação deste receptor nas alterações dos reflexos centrais do processo de micção após a lesão medular. Os fatores neurotróficos produzidos na bexiga urinária e/ou na medula espinhal unem-se a receptores Trk presentes em terminais periféricos ou centrais das fibras aferentes. Os receptores Trk ativados, são transportados retrogradamente, com ou sem o fator neurotrófico, pelas vias aferentes até os corpos celulares dos neurônios do GRD, onde promovem entre outras ações, aumento na síntese protéica, em especial no contexto deste estudo, de receptores TRPA1 e TRPV1 em fibras aferentes C, contribuindo para o desenvolvimento e manutenção da hiperatividade da bexiga urinária. GRD: gânglio da raiz dorsal; GPM: gânglio pélvico maior; EUE: esfíncter uretral externo; PMN: polimorfonuclear (neutrófilo); MPO: mieloperoxidase.

7 BIBLIOGRAFIA

Abrams, P., Cardozo, L., Fall, M., Griffiths, D., Rosier, P., Ulmsten, U., Van Kerrebroeck, P., Victor, A., Wein, A. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. **Neurourol Urodyn**, 21: 167-178, 2002.

Amaya, F., Shimosato, G., Nagano, M., Ueda, M., Hashimoto, S., Tanaka, Y., Suzuki, H., Tanaka, M. NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. **Eur J Neurosci**, 20: 2303-2310, 2004.

Anand, U., Otto, W.R., Facer, P., Zebda, N., Selmer, I., Gunthorpe, M.J., Chessell, I.P., Sinisi, M., Birch, R., Anand, P. TRPA1 receptor localisation in the human peripheral nervous system and functional studies in cultured human and rat sensory neurons. **Neurosci Lett**, 438: 221-227, 2008.

Andersson, D.A., Gentry, C., Moss, S., Bevan, S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. **J Neurosci**, 28: 2485-2494, 2008.

Andersson, K.E., Wein, A.J. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. **Pharmacol Rev**, 56: 581-631, 2004.

Andrade, E.L., Ferreira, J., André, E., Calixto, J.B. Contractile mechanisms coupled to TRPA1 receptor activation in rat urinary bladder. **Biochem Pharmacol**, 72: 104-114, 2006.

Apodaca, G. The uroepithelium: not just a passive barrier. **Traffic**, 5: 117-128, 2004.

Apodaca, G., Kiss, S., Ruiz, W., Meyers, S., Zeidel, M., Birder, L. Disruption of bladder epithelium barrier function after spinal cord injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, 284: F966-976, 2003.

Apostolidis, A., Brady, C.M., Yiangou, Y., Davis, J., Fowler, C.J., Anand, P. Capsaicin receptor TRPV1 in urothelium of neurogenic human bladders and effect of intravesical resiniferatoxin. **Urology**, 65: 400-405, 2005.

Avelino, A., Cruz, C., Nagy, I., Cruz, F. Vanilloid receptor 1 expression in the rat urinary tract. **Neuroscience**, 109: 787-798, 2002.

- Babes, A., Zorzon, D., Reid, G. Two populations of cold-sensitive neurons in rat dorsal root ganglia and their modulation by nerve growth factor. **Eur J Neurosci**, 20: 2276-2282, 2004.
- Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., Patapoutian, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, 41: 849-857, 2004.
- Baraldi, P.G., Preti, D., Materazzi, S., Geppetti, P. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Channel as Emerging Target for Novel Analgesics and Anti-Inflammatory Agents. **J Med Chem**, 2010.
- Basso, D.M., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **J Neurotrauma**, 12: 1-21, 1995.
- Bautista, D.M., Jordt, S.E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I., Julius, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**, 124: 1269-1282, 2006.
- Bautista, D.M., Movahed, P., Hinman, A., Axelsson, H.E., Sterner, O., Hogestatt, E.D., Julius, D., Jordt, S.E., Zygmunt, P.M. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. **Proc Natl Acad Sci USA**, 102: 12248-12252, 2005.
- Bessac, B.F., Sivula, M., von Hehn, C.A., Escalera, J., Cohn, L., Jordt, S.E. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. **J Clin Invest**, 118: 1899-1910, 2008.
- Bhave, G., Hu, H.J., Glauner, K.S., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., Gereau, R.W. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). **Proc Natl Acad Sci USA**, 100: 12480-12485, 2003.
- Birder, L. Role of the urothelium in bladder function. **Scand J Urol Nephrol Suppl**, 215: 48-53, 2004.
- Birder, L.A., Kanai, A.J., de Groat, W.C., Kiss, S., Nealen, M.L., Burke, N.E., Dineley, K.E., Watkins, S., Reynolds, I.J., Caterina, M.J. Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98: 13396-13401, 2001.
- Birder, L.A., Nakamura, Y., Kiss, S., Nealen, M.L., Barrick, S., Kanai, A.J., Wang, E., Ruiz, G., de Groat, W.C., Apodaca, G., Watkins, S., Caterina, M.J. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. **Nat Neurosci**, 5: 856-860, 2002.

- Black, J.A., Cummins, T.R., Yoshimura, N., de Groat, W.C., Waxman, S.G. Tetrodotoxin-resistant sodium channels Na(v)1.8/SNS and Na(v)1.9/NaN in afferent neurons innervating urinary bladder in control and spinal cord injured rats. **Brain Res**, 963: 132-138, 2003.
- Bleakman, D., Brorson, J.R., Miller, R.J. The effect of capsaicin on voltage-gated calcium currents and calcium signals in cultured dorsal root ganglion cells. **Br J Pharmacol**, 101: 423-431, 1990.
- Blok, B.F.M. Central pathways controlling micturition and urinary continence. **Urology**, 59: 13-17, 2002.
- Bouchelouche, K., Nordling, J. Recent developments in the management of interstitial cystitis. **Curr Opin Urol**, 13: 309-313, 2003.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72: 248-254, 1976.
- Brading, A.F. The physiology of the mammalian urinary outflow tract. **Exp Physiol**, 84: 215-221, 1999.
- Brady, C.M., Apostolidis, A.N., Harper, M., Yiangou, Y., Beckett, A., Jacques, T.S., Freeman, A., Scaravilli, F., Fowler, C.J., Anand, P. Parallel changes in bladder suburothelial vanilloid receptor TRPV1 and pan-neuronal marker PGP9.5 immunoreactivity in patients with neurogenic detrusor overactivity after intravesical resiniferatoxin treatment. **BJU Int**, 93: 770-776, 2004.
- Calixto, J.B. Multiple mechanisms of bradykinin-induced contraction in rat and guinea pig smooth muscles in vitro. **Eur J Pharmacol**, 281: 279-288, 1995.
- Campbell, M.F., Walsh, P.C., Retik, A.B. **Campbell's Urology**. WB Saunders: Philadelphia, 2002.
- Cardenas, D.D., Hoffman, J.M., Kirshblum, S., McKinley, W. Etiology and incidence of rehospitalization after traumatic spinal cord injury: a multicenter analysis. **Arch Phys Med Rehabil**, 85: 1757-1763, 2004.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389: 816-824, 1997.
- Cesare, P., Moriondo, A., Vellani, V., McNaughton, P.A. Ion channels gated by heat. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96: 7658-7663, 1999.
- Chai, T.C., Steers, W.C. Neurophysiology of micturition and continence. **Urol. Clin. North Am.** 23: 221-236, 1996.
- Chancellor, M.B., Blaivas, J.G. Spinal cord injury. In: **Practical Neuro-Urology: Genitourinary Complications of Neurologic Disease**. Newton: Butterworth-Heinemann, 99-118, 1996.

- Chancellor, M.B., Gajewski, J., Ackman, C.F., Appell, R.A., Bennett, J., Binard, J., Boone, T.B., Chetner, M.P., Crewalk, J.A., Defalco, A., Foote, J., Green, B., Juma, S., Jung, S.Y., Linsenmeyer, T.A., MacMillan, R., Mayo, M., Ozawa, H., Roehrborn, C.G., Shenot, P.J., Stone, A., Vazquez, A., Killorin, W., Rivas, D.A. Long-term followup of the North American multicenter UroLume trial for the treatment of external detrusor-sphincter dyssynergia. **J Urol**, 161: 1545-1550, 1999.
- Chancellor, M.B., Yoshimura, N. Neurophysiology of stress urinary incontinence. **Rev Urol.**, 3: S19-28, 2004.
- Ciobanu, C., Reid, G., Babes, A. Acute and chronic effects of neurotrophic factors BDNF and GDNF on responses mediated by thermo-sensitive TRP channels in cultured rat dorsal root ganglion neurons. **Brain Res**, 1284: 54-67, 2009.
- Clapham, D.E. TRP channels as cellular sensors. **Nature**, 426: 517-524, 2003.
- Cruz, C.D., Charrua, A., Vieira, E., Valente, J., Avelino, A., Cruz, F. Intrathecal delivery of resiniferatoxin (RTX) reduces detrusor overactivity and spinal expression of TRPV1 in spinal cord injured animals. **Exp Neurol**, 214: 301-308, 2008.
- Dai, Y., Wang, S., Tominaga, M., Yamamoto, S., Fukuoka, T., Higashi, T., Kobayashi, K., Obata, K., Yamanaka, H., Noguchi, K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. **J Clin Invest**, 117: 1979-1987, 2007.
- Dangelo, J.G., Fattini, C.A. **Anatomia básica dos sistemas orgânicos**. Atheneu: São Paulo, 493, 1997.
- de Groat, W. C., Kruse, M. N., Vizzard, M. A., Cheng, C.L., Araki, I., Yoshimura, N. Modification of urinary bladder function after spinal cord injury. In: **Advances in Neurology: Neuronal Regeneration, Reorganization, and Repair**. Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 347-364, 1997.
- de Groat, W.C. A neurologic basis for the overactive bladder. **Urology**, 50: 36-52, 1997.
- de Groat, W.C. Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. **Br J Pharmacol**, 147: S25-40, 2006.
- de Groat, W.C. Mechanisms underlying the recovery of lower urinary tract function following spinal cord injury. **Paraplegia**, 33: 493-505, 1995.
- de Groat, W.C. The urothelium in overactive bladder: passive bystander or active participant? **Urology**, 64: 7-11, 2004.

- de Groat, W.C., Booth, A.M., Yoshimura, N. Neurophysiology of micturition and its modification in animal models of human disease. In: **The autonomic nervous system nervous control of the urogenital system**. Harwood Academic Publishers: London, 227-289, 1993.
- Diogenes, A., Akopian, A.N., Hargreaves, K.M. NGF up-regulates TRPA1: implications for orofacial pain. **J Dent Res**, 86: 550-555, 2007.
- Du, S., Araki, I., Kobayashi, H., Zakoji, H., Sawada, N., Takeda, M. Differential expression profile of cold (TRPA1) and cool (TRPM8) receptors in human urogenital organs. **Urology**, 72: 450-455, 2008.
- Du, S., Araki, I., Yoshiyama, M., Nomura, T., Takeda, M. Transient receptor potential channel A1 involved in sensory transduction of rat urinary bladder through C-fiber pathway. **Urology**, 70: 826-831, 2007.
- Eid, S.R., Cortright, D.N. Transient receptor potential channels on sensory nerves. **Handb Exp Pharmacol**, 194: 261-281, 2009.
- Fam, B.A., Sarkarati, M., Yalla, S.V. Spinal cord injury. In: **Neurourology and Urodynamics**. Macmillan Publishing Company: New York, 291-302, 1998.
- Ford, A.P., Gever, J.R., Nunn, P.A., Zhong, Y., Cefalu, J.S., Dillon, M.P., Cockayne, D.A. Purinoceptors as therapeutic targets for lower urinary tract dysfunction. **Br J Pharmacol**, 147: S132-143, 2006.
- Fowler, C.J., Griffiths, D., de Groat, W.C. The neural control of micturition. **Nat Rev Neurosci**, 9: 453-466, 2008.
- Fry, C.H., Brading, A.F., Hussain, M., Lewis, S.A., Takeda, M., Tuttle, J.B., Uvelius, B., Wood, D.N., Drake, M. Cell Biology. In: **Incontinence**. Jersey: Health Publications: Jersey, 313-362, 2005.
- Gabella, G., Davis, C. Distribution of afferent axons in the bladder of rats. **J Neurocytol**, 27:141-155, 1998.
- Geirsson, G., Fall, M., Lindström, S. The ice-water test: a simple and valuable supplement to routine cystometry. **Br J Urol**, 71: 681-685, 1993.
- Gillespie, J.I., van Koevinge, G.A., de Wachter, S.G., de Vente, J. On the origins of the sensory output from the bladder: the concept of afferent noise. **BJU Int**, 103: 1324-1333, 2009.
- Gomes, D.A., Guatimosim, C., Gomez, R.S., Leite, M.F., Vieira, L.B., Prado, M.A., Romano-Silva, M.A., Gomez, M.V. Effect of halothane on the release of $[Ca^{2+}]_i$ in dorsal root ganglion neurons. **Neuroreport**, 15:1187-1190, 2004.
- Graaf, K.M.V., Rheess, R.W. **Anatomia e Fisiologia Humana**. McGraw-Hill e Makron: São Paulo, 1991.

- Gratzke, C., Streng, T., Waldkirch, E., Sigl, K., Stief, C., Andersson, K.E., Hedlund, P. Transient receptor potential A1 (TRPA1) activity in the human urethra-evidence for a functional role for TRPA1 in the outflow region. **Eur Urol**, 55: 696-704, 2009.
- Herrera, J.J., Haywood-Watson, R.J., Grill, R.J. Acute and chronic deficits in the urinary bladder after spinal contusion injury in the adult rat. **J Neurotrauma**, 27: 423-431, 2010.
- Hinata, N., Shirakawa, T., Okada, H., Achaya, B., Kamidono, S., Gotoh, A. Quantitative analysis of the levels of expression of muscarinic receptor subtype RNA in the detrusor muscle of patients with overactive bladder. **Mol Diagn**, 8: 17-22, 2004.
- Hinman, A., Chuang, H.H., Bautista, D.M., Julius, D. TRP channel activation by reversible covalent modification. **Proc Natl Acad Sci USA**, 103: 19564-19568, 2006.
- Hwang, S.W., Cho, H., Kwak, J., Lee, S.Y., Jung, J., Cho, S., Min, K.H., Suh, Y.G., Kim, D., Oh, U. Direct activation of capsaicin receptor by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. **Proc Natl Acad Sci USA**, 97: 6155-6160, 2000.
- Ikeda, Y., Kanai, A. Urotheliogenic modulation of intrinsic activity in spinal cord-transected rat bladders: role of mucosal muscarinic receptors. **Am J Physiol Renal Physiol**, 295: F454-461, 2008.
- Iwatsubo, E., Koyanagi, T., Wyndaele, J.J., El Masri, W.S., Diokno, A.C. Urological management of tetraplegic patients. **Spinal Cord**, 37: 1-5, 1999.
- Jaquemar, D., Schenker, T., Trueb, B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. **J Biol Chem**, 274: 7325-7333, 1999.
- Jordt, S.E., Bautista, D.M., Chuang, H.H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Hogestatt, E.D., Meng, I.D., Julius, D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**, 427:260-265, 2004.
- Kanai, A., Andersson, K.E. Bladder afferent signaling: recent findings. **J Urol**, 183: 128812-12895, 2010.
- Kang, K., Pulver, S.R., Panzano, V.C., Chang, E.C., Griffith, L.C., Theobald, D.L., Garrity, P.A., Karashima, Y., Prenen, J., Meseguer, V., Owsianik, G., Voets, T., Nilius, B. Modulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate manipulators. **Pflugers Arch**, 457: 77-89, 2008.

- Kang, K., Pulver, S.R., Panzano, V.C., Chang, E.C., Griffith, L.C., Theobald, D.L., Garrity, P.A. Analysis of *Drosophila* TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception. **Nature**, 464: 597-600, 2010.
- Karashima, Y., Prenen, J., Meseguer, V., Owsianik, G., Voets, T., Nilius, B. Modulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate manipulators. **Pfluegers Arch**, 457: 77-89, 2008.
- Karsenty, G., Reitz, A., Wefer, B., Boy, S., Schurch, B. Understanding detrusor sphincter dyssynergia-significance of chronology. **Urology**, 66: 763-768, 2005.
- Kerekes, N., Landry, M., Lundmark, K., Hökfelt, T. Effect of NGF, BDNF, bFGF, aFGF and cell density on NPY expression in cultured rat dorsal root ganglion neurones. **J Auton Nerv Syst**, 81: 128-138, 2000.
- Kim, J.C., Yoo, J.S., Park, E.Y., Hong, S.H., Seo, S.I., Hwang, T.K. Muscarinic and purinergic receptor expression in the urothelium of rats with detrusor overactivity induced by bladder outlet obstruction. **BJU Int**, 101: 371-375, 2008.
- Kruse, M.N., Bray, L.A., de Groat, W.C. Influence of spinal cord injury on the morphology of bladder afferent and efferent neurons. **J Auton Nerv Syst**, 54: 215-224, 1995.
- Kuruvilla, R., Zweifel, L.S., Glebova, N.O., Lonze, B.E., Valdez, G., Ye, H., Ginty, D.D. A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. **Cell**, 118: 243-255, 2004.
- Kwan, K.Y., Allchorne, A.J., Vollrath, M.A., Christensen, A.P., Zhang, D.S., Woolf, C. J., Corey, D.P. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. **Neuron**, 50: 277-289, 2006.
- Lazzeri, M., Vannucchi, M.G., Zardo, C., Spinelli, M., Beneforti, P., Turini, D., Faussone-Pellegrini, M.S. Immunohistochemical evidence of vanilloid receptor 1 in normal human urinary bladder. **Eur Urol**, 46: 792-798, 2004.
- Lecci, A., Maggi, C.A. Overactive urinary bladder: Targeting sensory pathways. **Drug Discov Today**, 2: 15-23, 2005.
- Lee, G., Abdi, K., Jiang, Y., Michaely, P., Bennett, V., Marszalek, P.E. Nanospring behaviour of ankyrin repeats. **Nature**, 440: 246-249, 2006.
- Lianza, S., Casalis, M.E., Greve, J.M.D., Eichberg, R. A lesão medular. In: **Medicina de Reabilitação**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 299-322, 2001.

- Macpherson, L. J., Geierstanger, B. H., Viswanath, V., Bandell, M., Eid, S. R., Hwang, S., Patapoutian, A. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. **Curr Biol**, 15: 929-934, 2005.
- Macpherson, L.J., Dubin, A.E., Evans, M.J., Marr, F., Schultz, P.G., Cravatt, B.F., Patapoutian, A. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. **Nature**, 445: 541-545, 2007.
- Miller, F.D., Kaplan, D.R. On Trk for retrograde signaling. **Neuron**, 32: 767-700, 2001.
- Montell, C. Thermosensation: hot findings make TRPNs very cold. **Curr Biol**, 13: R476-R478, 2003.
- Moran, M.M., Fanger, C., Chong, J.A., Mcnamara, C., Zhen, X., Mandel-Brehm, J. International application published under the patent cooperation treaty (PCT). WO 2007/073505 A2, 2007.
- Morrison, J., Birder, L., Craggs, M., De Groat, W.C., Downie, J., Drake, M., Fowler, C., Thor, K. Neural control. In: **Incontinence**. Health Publications: Jersey, 363-422, 2005.
- Nagata, K., Duggan, A., Kumar, G., García-Añoveros, J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. **J Neurosci**, 25: 4052-4061, 2005.
- Nagatomi, J., Gloeckner, D.C., Chancellor, M.B., de Groat, W.C., Sacks, M.S. Changes in the biaxial viscoelastic response of the urinary bladder following spinal cord injury. **Ann Biomed Eng**, 32: 1409-1419, 2004.
- Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Tominaga, M., Noguchi, K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **J Clin Invest**, 115: 2393-2401, 2005.
- Ogawa, T., Sasatomi, K., Hiragata, S., Seki, S., Nishizawa, O., Chermansky, C.J., Pflug, B.R., Nelson, J.B., Chancellor, M.B., Yoshimura, N. Therapeutic effects of endothelin-A receptor antagonist on bladder overactivity in rats with chronic spinal cord injury. **Urology**, 71: 341-345, 2008.
- Ouslander, J.G. Management of overactive bladder. **N Engl J Med**, 350: 786-799, 2004.
- Pannek, J., Janek, S., Sommerer, F., Tannapfel, A. Expression of purinergic P2X2-receptors in neurogenic bladder dysfunction due to spinal cord injury: a preliminary immunohistochemical study. **Spinal Cord**, 47: 561-564, 2009.

- Premkumar, L.S., Ahern, G.P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature**, 408: 985-990, 2000.
- Reichardt, L.F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 361: 1545-1564, 2006.
- Salas, M.M., Hargreaves, K.M., Akopian, A.N. TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. **Eur J Neurosci**, 29: 1568-1578, 2009.
- Santos-Benito, F.F., Muñoz-Quiles, C., Ramón-Cueto, A. Long-term care of paraplegic laboratory mammals. **J Neurotrauma**, 23: 521-536, 2006.
- Sawada, Y., Hosokawa, H., Matsumura, K., Kobayashi, S. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. **Eur J Neurosci**, 27: 1131-1142, 2008.
- Schmidt, M., Dubin, A.E., Petrus, M.J., Earley, T.J., Patapoutian, A. Nociceptive signals induce trafficking of TRPA1 to the plasma membrane. **Neuron**, 64: 498-509, 2009.
- Schmitz, T.J. Lesão Medular Traumática. In: **Fisioterapia Avaliação e Tratamento**. Manole: São Paulo, 874-87, 2004.
- Schwab, J.M., Brechtel, K., Mueller, C.A., Failli, V., Kaps, H.P., Tuli, S.K., Schluesener, H.J. Experimental strategies to promote spinal cord regeneration - an integrative perspective. **Prog Neurobiol**, 78: 91-116, 2006.
- Seki, S., Sasaki, K., Fraser, M.O., Igawa, Y., Nishizawa, O., Chancellor, M.B., de Groat, W.C., Yoshimura, N. Immunoneutralization of nerve growth factor in lumbosacral spinal cord reduces bladder hyperreflexia in spinal cord injured rats. **J Urol**, 168: 2269-2274, 2002.
- Seki, S., Sasaki, K., Igawa, Y., Nishizawa, O., Chancellor, M.B., de Groat, W.C., Yoshimura, N. Suppression of detrusor sphincter dyssynergia by immunoneutralization of nerve growth factor in lumbosacral spinal cord in spinal cord injured rats. **J Urol**, 171: 478-482, 2004.
- Semins, M.J., Chancellor, M.B. Diagnosis and management of patients with overactive bladder syndrome and abnormal detrusor activity. **Nat Clin Pract Urol**, 1: 78-84, 2004.
- Shefchyk, S.J. Spinal mechanisms contributing to urethral striated sphincter control during continence and micturition: "how good things might go bad". **Prog Brain Res**, 52: 85-95, 2006.
- Silva, W.A., Karram, M.M. Anatomy and physiology of the pelvic floor. **Minerva Ginecol**, 56: 283-302, 2004.

- Smith, H. S. Hydrogen sulfide's involvement in modulating nociception. **Pain Physician**, 12: 901-910, 2009.
- Souza, D.G., Coutinho, S.F., Silveira, M.R., Cara, D.C. Teixeira, M.M., Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. **Eur J Pharmacol**, 403: 121-128, 2000.
- Staruschenko, A., Jeske, N.A., Akopian, A.N. Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single-channel properties of the TRPA1 channel. **J Biol Chem**, 2010.
- Steers, W.D. Pathophysiology of overactive bladder and urge urinary incontinence. **Rev Urol**, 4: S7-S18, 2002.
- Steers, W.D., Ciambotti, J., Etzel, B., Erdman, S., de Groat, W.C. Alterations in afferent pathways from the urinary bladder of the rat in response to partial urethral obstruction. **J Comp Neurol**, 310: 401-410, 1991.
- Steers, W.D., Creedon, D.J., Tuttle, J.B. Immunity to nerve growth factor prevents afferent plasticity following urinary bladder hypertrophy. **J Urol**, 155:379-385, 1996.
- Steers, W.D., Tuttle, J.B. Mechanisms of Disease: the role of nerve growth factor in the pathophysiology of bladder disorders. **Nat Clin Pract Urol**, 3: 101-110, 2006.
- Stevens, L.A., Sellers, D.J., McKay, N.G., Chapple, C.R., Chess-Williams. R. Muscarinic receptor function, density and G-protein coupling in the overactive diabetic rat bladder. **Auton Autacoid Pharmacol**, 26: 303-309, 2006.
- Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., Patapoutian, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, 112: 819-829, 2003.
- Streng, T., Axelsson, H.E., Hedlund, P., Andersson, D.A., Jordt, S.E., Bevan, S., Andersson, K.E., Högestätt, E.D., Zygmunt, P.M. Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. **Eur Urol**, 53: 391-399, 2008.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol Rev**, 51: 159-212, 1999.
- Tai, C., Roppolo, J.R., de Groat, W.C. Spinal reflex control of micturition after spinal cord injury. **Restor Neurol Neurosci**, 24: 69-78, 2006.

- Takahara, Y., Maeda, M., Nakatani, T., Kiyama, H. Transient suppression of the vesicular acetylcholine transporter in urinary bladder pathways following spinal cord injury. **Brain Res**, 1137: 20-28, 2007.
- Takahashi, N., Mizuno, Y., Kozai, D., Yamamoto, S., Kiyonaka, S., Shibata, T., Uchida, K., Mori, Y. Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. **Channels** 2:287-298, 2008.
- Taylor-Clark, T.E., Ghatta, S., Bettner, W., Udem, B.J. Nitrooleic acid, an endogenous product of nitrative stress, activates nociceptive sensory nerves via the direct activation of TRPA1. **Mol Pharmacol**, 75: 820-829, 2009.
- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B. Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Bausbam, A.I., Julius, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, 21: 531-543, 1998.
- Turner, W.H., Brading, A.F. Smooth muscle of the bladder in the normal and the diseased state: pathophysiology, diagnosis and treatment. **Pharmacol Ther**, 75: 77-110, 1997.
- Vanický, I., Urdzík, L., Saganová, K., Cízková, D., Gálik, J. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. **J Neurotrauma**, 18: 1399-1407, 2001.
- Vizzard, M.A. Alterations in growth-associated protein (GAP-43) expression in lower urinary tract pathways following chronic spinal cord injury. **Somatosens Mot Res**, 16: 369-381, 1999.
- Vizzard, M.A. Changes in urinary bladder neurotrophic factor mRNA and NGF protein following urinary bladder dysfunction. **Exp Neurol**, 161: 273-284, 2000.
- Wang, S., Dai, Y., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Cui, X., Tominaga, M., Noguchi, K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain**, 131: 1241-1251, 2008.
- Xu, H., Delling, M., Jun, J.C., Clapham, D E. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. **Nat Neurosci**, 9: 628-635, 2006.
- Yamaguchi, O. Response of bladder smooth muscle cells to obstruction: signal transduction and the role of mechanosensors. **Urology**, 63: 11-6, 2004.
- Yiangou, Y., Facer, P., Ford, A., Brady, C., Wiseman, O., Fowler, C.J., Anand, P. Capsaicin receptor VR1 and ATP-gated ion channel P2X3 in human urinary bladder. **BJU Int**, 87: 774-779, 2001.

- Yoshimura, N., Bennett, N.E., Hayashi, Y., Ogawa, T., Nishizawa, O., Chancellor, M.B., de Groat, W.C., Seki, S. Bladder overactivity and hyperexcitability of bladder afferent neurons after intrathecal delivery of nerve growth factor in rats. **J Neurosci**, 26: 10847-10855, 2006.
- Yoshimura, N., Chancellor, M.B. Neurophysiology of lower urinary tract function and dysfunction. **Rev Urol**, 5: S3-S10, 2003.
- Yoshimura, N., de Groat, W.C. Neural control of the lower urinary tract. **Intern J Urol**, 4: 111, 1997a.
- Yoshimura, N., de Groat, W.C. Plasticity of Na⁺ channels in afferent neurones innervating rat urinary bladder following spinal cord injury. **J Physiol**, 503: 269-276, 1997b.
- Yoshimura, N., Kaiho, Y., Miyazato, M., Yunoki, T., Tai, C., Chancellor, M.B., Tyagi, P. Therapeutic receptor targets for lower urinary tract dysfunction. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 377: 437-448, 2008.
- Zhang, X., Huang, J., McNaughton, P.A. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. **EMBO J**, 24: 4211-4223, 2005.
- Zvara, P., Kliment, J.Jr., DeRoss, A.L., Irwin, B.H., Malley, S.E., Plante, M.K., Vizzard, M.A. Differential expression of bladder neurotrophic factor mRNA in male and female rats after bladder outflow obstruction. **J Urol**, 168: 2682-2688, 2002.
- Zvara, P., Vizzard, M.A. Exogenous overexpression of nerve growth factor in the urinary bladder produces bladder overactivity and altered micturition circuitry in the lumbosacral spinal cord. **BMC Physiol**, 7: 9, 2007.
- Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D., Hogestatt, E.D. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**, 400: 452-457, 1999.

8. ANEXOS

Escala BBB de avaliação funcional (Basso et al., 1995)

Movimento do Membro Posterior						Posição do Tronco		Abdome	Movimento da Pata Dançeira						Pisada		C o o r d e n a ç ã o	Liberação dos Dedos		Posição Predominante da Pata		I n s t a b i l i d a d e	Cauda		
Quadril		Joelho		Tornozelo		Lado	Apoio		Apoio da Pata				Dorsal		Plantar			E	D	E	D			E	D
E	D	E	D	E	D				Balanço	Sem Suporte de Peso	Com Suporte de Peso	E	D	E	D	E									
0	0	0	0	0	0	E	D	Arrastando	0	0	0	0	0	0*	0*	I	I	I	I	Para Cima (elevada)					
S	S	S	S	S	S	E	D	Paralelo	E	D	E	D	E	O	O	O	O	E	E	E	E	Para Baixo (abaixada)			
E	E	E	E	E	E	Central		Alto	F	F	F	F	F	F**	F**	P	P	P	P						
									C	C	C	C	C	C	C										

Rato: _____ Data / / 200 _____ Dias Pós-Operatório _____ Pontuação Esquerdo: _____ Direito: _____

Movimento	+	Pisada Dorsal > 4 passos da pata posterior	0	Nunca (0%)	I	Rotação Interna
0	Nenhum	* Liberação < 50%	O	Ocasional (< 50%)	E	Rotação Externa
S	Suaive (discreto)	** Dedos Arrastando > 4 passos da pata posterior	F	Freqüente (51-94%)	P	Paralelo
E	Extenso		C	Consistente (95-100%)		

Escala BBB de avaliação funcional de 21 pontos (Basso et al., 1995)

PONTUAÇÃO	DEFINIÇÕES OPERACIONAIS DE CATEGORIAS E ATRIBUTOS
0	Nenhum movimento observável do membro posterior.
1	Movimento discreto (limitado) de uma ou de duas articulações, geralmente do quadril e/ou dos joelhos.
2	Movimento extenso de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreta de outra.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior.
5	Movimento discreto de duas articulações e movimento extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e movimento discreto da terceira.
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior.
8	Pedalada sem suporte de peso ou apoio plantar da pata sem suporte de peso.
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (i.e. quando estático) ou passada dorsal ocasional, freqüente ou consistente com suporte de peso e nenhuma passada plantar.
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
11	Passo plantar com suporte de peso freqüente à consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
12	Passo plantar com suporte de peso freqüente à consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior.
13	Passo plantar com suporte de peso freqüente à consistente e coordenação freqüente dos membros anterior e posterior.
14	Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície (piso) bem como, antes de liberar os dedos no final da fase de apoio ou passada plantar freqüente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.

15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.
16	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação.
17	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial e liberação dos dedos.
18	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos.
19	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.
20	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco.
21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, cauda consistentemente elevada.

DEFINIÇÕES	
Discreta	Movimento parcial da articulação, inferior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Extensa	Movimento parcial da articulação, superior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Pedalada	Movimento rítmico do membro posterior no qual suas três articulações estão estendidas, em seguida completamente flexionadas e novamente estendidas, o animal geralmente inclina-se lateralmente, a superfície plantar da pata pode ou não tocar o solo, nenhum suporte de peso corpóreo é evidente por toda a pata posterior.
Sem suporte de peso	Nenhuma contração dos músculos extensores do membro posterior durante pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa.
Com suporte de peso	Contração dos músculos extensores do membro posterior durante a pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa.
Passada plantar	A pata está em contato plantar com suporte de peso, em seguida ocorre o movimento do membro para frente até ser restabelecido o contato plantar com suporte de peso.
Passada dorsal	O peso é suportado pela superfície dorsal da pata em qualquer ponto do ciclo do passo.
Coordenação dos membros anterior e posterior	Para todo o passo do membro anterior ocorre um passo do membro posterior e os membros posteriores se alternam.
Ocasional	Menos do que ou igual à metade das vezes, < ou igual a 50%.
Frequente	Mais do que a metade, mas não sempre, 51-94%.
Consistente	Quase sempre ou sempre, 95-100%.
Instabilidade do tronco	Laterização do peso que causa oscilação de um lado a outro ou colapso parcial do tronco.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)